

诺氏疟原虫裂殖体期感染红细胞的分离方法

李英杰 许日成

(第一军医大学疟疾免疫研究室,广州)

在疟疾免疫学研究中,为了制备裂殖子抗原,需要从感染血中分离出裂殖体期疟原虫所寄生的红细胞,并对其短期培养,以收集细胞外的游离裂殖子。我们借用木下喜博^[1]用阿拉伯胶液密度梯度离心分离淋巴细胞的方法,分离诺氏疟原虫裂殖体期感染的红细胞,获得了一些初步结果。

材 料 和 方 法

一、感染血的采集

当诺氏疟原虫发育到4—8核的裂殖体期为主时,由感染的恒河猴体内采血,用肝素钠溶液抗血凝。

二、试剂配制

1. 磷酸缓冲糖溶液(克): NaCl 0.8, KCl 0.02, Na₂HPO₄ 0.15, KH₂PO₄ 0.02, 葡萄糖 0.02, 蒸馏水 100 毫升, pH 7.4。

2. 阿拉伯胶液: 按照配制浓度分别称取阿拉伯树胶粉(英国进口) 15 克、20 克和 25 克放烧杯内,各杯加入磷酸缓冲糖溶液 100 毫升,加热溶解,离心(3000 转/分钟) 15 分钟,吸取上清液,用 1N 氢氧化钠溶液调 pH 为 7.4,经高压灭菌后备用。

三、离心方法

首先吸取一定量的阿拉伯胶液,沿离心管壁缓慢加入离心管底部,再取等量的感染血缓慢地置于阿拉伯胶液的上层。用 TJ—74—1 型电动离心沉淀机离心后,位于阿拉伯胶液之上的沉淀层为第一层(即裂殖体感染细胞层);位于离心管底部的沉淀层为第二层。小心地吸出

各沉淀层,分别加 10 倍量的磷酸缓冲糖溶液,离心洗 2 次(1500 转/分钟,15 分钟),去除粘在红细胞外面的阿拉伯胶。

四、检查方法

将沉淀红细胞涂制薄血膜,姬氏染液染色镜检。连续查 10 个视野内感染的和正常的红细胞数,分别统计各发育期疟原虫的百分数。

试 验 结 果

一、不同离心速度和时间对分离效果的影响

感染血与 25% 阿拉伯胶液各 5 毫升(或按 1:1 体积比)混合,进行分离。结果以 600 转/分钟,离心 5 分钟,而后以 1000 转/分钟,离心 10 分钟的效果最好。在第一层内感染红细胞占 95.92%,正常红细胞的污染仅有 4.08%。在第一层内裂殖体感染红细胞占 61.00%,成熟滋养体寄生红细胞占 34.50%(见表 1)。

二、不同浓度的阿拉伯胶液对分离效果的影响

在相同血量(5 毫升)和相同离心速度及时间(600 转/分钟,5 分钟→1000 转/分钟,10 分钟)的条件下,按 1:1 比例,将感染血分别与 15%、20% 和 25% 三种浓度的阿拉伯胶液混合,分别离心,观察其对分离效果的影响。结果三者无明显差别,在第一层内的感染红细胞均占 95% 以上(见表 2)。

三、感染血与阿拉伯胶液不同比例对分离效果的影响

在相同血量(5 毫升)和相同离心速度及时间(600 转/分钟,5 分钟→1000 转/分钟,10 分

表 1 不同离心速度和时间对分离效果的影响

离心速度 (转/分钟)	时间 (分钟)	感染红细胞数(%)			原虫分类数*(%)								
		分离前	分离后		分离前			分离后					
			第一层	第二层	环状体	滋养体	裂殖体	第一层			第二层		
								环状体	滋养体	裂殖体	环状体	滋养体	裂殖体
600	15	45.32	83.53	22.57	0.50	36	53	0.5	47.5	48	6.5	44	47.0
800	10	45.32	85.05	15.79	0.5	36	53	0	34.5	63	8.5	40	49.5
600 →1000	5 10	45.32	95.92	43.99	0.5	36	53	0	34.5	61	15	50.5	31.5

* 连续检查 200 个原虫计数(下同)。

表 2 不同浓度的阿拉伯胶液对分离效果的影响

阿拉伯胶 液浓度 (%)	感染红细胞数(%)			原虫分类数(%)								
	分离前	分离后		分离前			分离后					
		第一层	第二层	环状体	滋养体	裂殖体	第一层			第二层		
							环状体	滋养体	裂殖体	环状体	滋养体	裂殖体
15	45.32	97.81	90.6	0.5	36	53	0	21	73.5	14	45.5	38.0
20	45.32	99.72	17.51	0.5	36	53	0	25	72.5	11	38.0	48.0
25	45.32	95.92	43.99	0.5	36	53	0	34	61.0	15	50.5	31.5

表 3 感染血与阿拉伯胶液不同比例对分离效果的影响

感染血: 阿拉伯胶 液(浓度)	感染红细胞数(%)			原虫分类数(%)								
	分离前	分离后		分离前			分离后					
		第一层	第二层	环状体	滋养体	裂殖体	第一层			第二层		
							环状体	滋养体	裂殖体	环状体	滋养体	裂殖体
1:1(25%)	8.60	96.91	11.23	9.5	22	66	0	19.0	74.5	18.5	32.0	62.5
1:2(25%)	20.46	93.17	9.22	1.5	23	73	0	29.0	69.0	10.5	26.5	59.0
1:1(25%):1(30%)	20.46	79.94	未计	1.5	23	73	0	21.5	71.0	未计	未计	未计

表 4 不同疟原虫密度对分离效果的影响

疟原虫 密度 (%)	感染红细胞数(%)			疟原虫分类数(%)								
	分离前	分离后		分离前			分离后					
		第一层	第二层	环状体	滋养体	裂殖体	第一层			第二层		
							环状体	滋养体	裂殖体	环状体	滋养体	裂殖体
8.63	8.63	96.11	3.03	5.5	40	50	0	31.5	62	8.0	48.0	41
20.46	20.46	93.17	9.22	1.5	23	73	0	29.0	69	10.5	26.5	59
45.32	45.32	91.52	14.02	0.5	36	53	0	27.5	70	10.5	37.0	37

的条件下,感染血与阿拉伯胶液以不同比例混合,进行分离,其效果见表 3。表 3 表明,按 1:1(1 份感染血; 1 份 25% 阿拉伯胶液)离心后的第一层内感染红细胞占 96.91%,按 1:2

(1 份感染血; 2 份 25% 阿拉伯胶液)者占 93.17%,而按 1:1:1(1 份感染血; 1 份 25% 阿拉伯胶液; 1 份 30% 阿拉伯胶液)的分离效果较差,在第一层内感染红细胞仅占 79.94%,有

较多正常红细胞的污染。

四、不同原虫密度对分离效果的影响

在相同血量(5毫升)和相同离心速度及时间(600转/分钟,5分钟→1000转/分钟,10分钟),以及相同的1:1(1份感染血;1份25%阿拉伯胶液)条件下,观察感染血含不同疟原虫密度对分离效果的影响。表4结果表明,疟原虫密度为8.63%时,离心后的第一层内感染红细胞占96.11%,疟原虫密度为20.46%时,占93.17%,疟原虫密度达45.32%时,其第一层内感染红细胞占91.52%。

讨 论

1. 疟原虫与红细胞有不同的致密度,而感染红细胞比未感染红细胞的沉降速度慢,利用这两个特点,提出了将疟原虫寄生红细胞与正常红细胞分开,或将不同发育期的疟原虫寄生红细胞分开的各种方法。

2. 裂殖体感染红细胞的比重小于1.043,含滋养体者在1.081和1.091之间,未感染红细胞

和含环状体红细胞的比重略大于1.091^[2],所以制备1.055—1.096密度范围的溶液,可使各种感染细胞与未感染细胞分离开。

3. 我们借用木下喜博分离淋巴细胞的方法,分离诺氏疟原虫裂殖体感染的恒河猴红细胞,得到满意的结果。实验证明,阿拉伯胶液的15%、20%、25%三种浓度均适宜做不连续密度梯度离心,经600转/分钟,离心5分钟,而后加速1000转/分钟,离心10分钟的低速离心后,可以获得较好的分离效果。裂殖体感染红细胞的纯度达95%以上,很少有正常红细胞的污染,对疟原虫的活性和形态均无影响,根据疟原虫体外培养实验,在培养4—6小时后即可产生大量裂殖子。我们提供的阿拉伯胶液密度梯度,低速快速离心分离裂殖体感染红细胞的方法,虽然对研究诺氏疟原虫裂殖子制剂的免疫原性是一个较好的方法,但它是否能适用于分离恶性疟原虫感染血,还有待进一步的实验来证明。

参 考 文 献

- [1] 木下喜博:最新医学,27: 577, 1972。
- [2] Kreier, J. P.: Bull. WHO., 55: 317, 1977。