

制备间接血凝试验抗原用弓形虫速殖子的净化

俞乃勋 陈金伟 金柏新 吴硕显

(上海市农业科学院畜牧兽医研究所, 上海)

弓形虫 (*Toxoplasma gondii*) 又名弓形体或弓浆虫, 能引起人畜的弓形虫病。在弓形虫的生物学特性和免疫学等研究中, 为了得到纯净的弓形虫速殖子, 必须从感染小白鼠腹腔渗出物中去除多量的腹腔细胞和炎性细胞。国外有应用多孔玻璃滤器过滤, 用超声波裂解腹腔细胞, 再用胰蛋白酶消化细胞碎片, 用梯度离心和加绿脓杆菌溶血素等方法来净化弓形虫速殖子^[1-7]。但这些方法不是操作繁杂, 就是虫体损失严重。我们采用了胰蛋白酶消化法净化感染鼠腹腔渗出物中的弓形虫速殖子。此法操作简便, 净化效果好, 游离虫体数非但不减少, 反有增加。用净化的弓形虫速殖子制备间接血凝抗原, 效果良好。

材料与方 法

1. 弓形虫速殖子: 虫株系 1977 年 6 月我

们从上海急性感染病猪中分离的长宁 (CN) 株弓形虫。取 CN 株弓形虫感染的小白鼠腹腔渗出物 0.1ml, 腹腔接种体重约 20g 的健康小白鼠, 4 天后扑杀感染鼠, 腹腔内注入灭菌生理盐水 1ml 洗涤腹腔。吸出腹腔洗涤液 (有出血者弃去), 3000rpm 离心 15 分钟, 去上清, 沉积物作消化用。

2. 弓形虫速殖子的胰蛋白酶消化法: 将上述离心沉积物用灭菌生理盐水离心洗涤 3 次, 加入为沉积物 30—40 倍量的 0.25% 胰蛋白酶磷酸缓冲液 (0.2M, pH7.6), 混匀, 在 38℃ 水浴中消化 20 分钟。消化后用生理盐水离心洗涤 5 次, 沉积物如上重复消化 1 次, 离心洗涤至上清液澄清, 即得纯净的弓形虫速殖子。

用红细胞计数法计数每毫升胰蛋白酶消化前后感染鼠腹腔渗出物悬液中的腹腔细胞和游离弓形虫速殖子数。

3. 净化后弓形虫速殖子的致病性测定: 取洗涤 3 次的感染鼠腹腔渗出物和胰蛋白酶净化的弓形虫速殖子各 150 万个, 未经处理的感染鼠腹腔渗出液 0.1 ml (约含 150—200 万个虫体), 分别接种小白鼠 4 只, 比较其对小白鼠的致病力。

4. 净化弓形虫速殖子所制备抗原的间接血凝试验: 取经净化的弓形虫速殖子离心洗涤后, 按每 10 只感染鼠腹腔渗出物中的虫体制备 2ml 抗原计算, 加入灭菌双蒸水, 混匀, -20°C 反复冻融 5 次, 3000 rpm 离心 30 分钟, 取上清液加等量 1.7% NaCl 溶液作为抗原。另取 10 只小白鼠腹腔渗出物, 用生理盐水离心洗涤 5 次, 沉积物按上述方法和剂量加灭菌双蒸水, 制备成抗原。

将上述抗原用生理盐水作不同倍数稀释, 分别取稀释抗原 0.25 ml, 在 pH 4.8, 37°C 下致敏鞣酸化丙酮醛-甲醛固定绵羊红细胞, 致敏 60 分钟。用致敏绵羊红细胞在 96 孔 V 型微量血凝反应板上进行间接血凝试验, 测定同一份弓形虫病阳性血清, 比较其血凝效价。用已知阳性、阴性血清和不致敏绵羊红细胞作对照。

结 果

一、胰蛋白酶消化法净化弓形虫速殖子的效果

感染弓形虫小白鼠的腹腔渗出物, 经胰蛋白酶 2 次消化可去除 98.7% 腹腔细胞。由于腹腔细胞破坏, 细胞内虫体释放, 因而游离弓形虫速殖子数增加 94.4% (见表 1, 图 1, 2)。

表 1 胰蛋白酶消化前、后腹腔细胞和游离弓形虫速殖子数

批次	腹腔细胞(万)			弓形虫速殖子(万)		
	前	后	减少(%)	前	后	增加(%)
1	68	4	94.1	159	212	33.3
2	123	1	99.2	102	343	236.2
3	87	2	97.7	101	327	223.7
4	71	0	100.0	113	201	77.8
5	110	1	99.1	204	285	39.7
6	112	0	100.0	169	391	131.3
7	94	1	98.9	193	265	37.3
共计	665	9	98.7	1041	2024	94.4

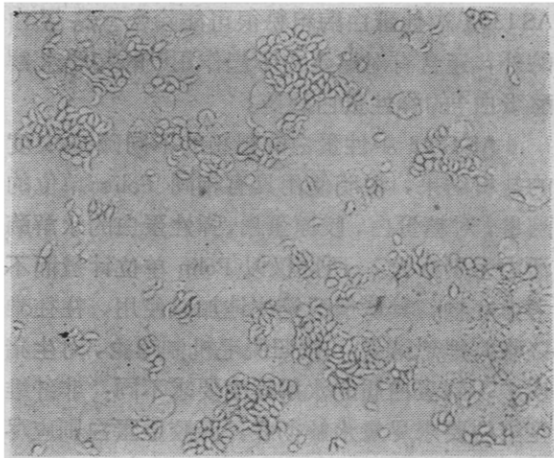


图 1 胰蛋白酶消化前感染弓形虫小白鼠的腹腔渗出物, $\times 400$



图 2 胰蛋白酶 2 次消化后的弓形虫速殖子, $\times 400$

二、胰蛋白酶消化对弓形虫速殖子致病力的影响

接种感染鼠腹腔渗出物的小白鼠较接种感染鼠腹腔渗出液原液者延迟 2 天死亡。接种胰蛋白酶净化的弓形虫速殖子与接种生理盐水洗涤的腹腔渗出物比较, 对小白鼠的致病力没有区别 (见表 2)。

三、净化弓形虫速殖子制备抗原的间接血凝试验效果

用胰蛋白酶净化的弓形虫速殖子制备的抗原, 比用未消化感染鼠腹腔渗出物制备的抗原, 其间接血凝效价在抗原高倍稀释时有所增高 (见表 3)。

表 2 胰蛋白酶消化对弓形虫速殖子致病力的影响

处 理 方 法	接种小白鼠只数	接种虫体数(万)	死亡只数	接种至死亡天数
未 处 理	4	150—200	4	4—5
生理盐水洗涤 3 次	4	150	4	6—7
胰蛋白酶消化 2 次	4	150	4	6—7

表 3 胰蛋白酶消化法净化的弓形虫速殖子所制备抗原间接血凝效价

抗原种类	抗原用量 (ml)	抗 原 稀 释			
		不稀释	1:2	1:3	1:4.5
消 化	0.25	2048	2048	1024	1024
未 消 化	0.25	2048	1024	512	64

表 4 从感染小白鼠腹腔渗出物中净化弓形虫速殖子效果的比较

净 化 方 法	腹腔细胞去除率	弓形虫回收率	作 者
多孔玻璃滤器过滤	100	接近 100	Fulton et al. ^[1]
超声波裂解后用胰蛋白酶消化细胞碎片 玻璃滤器过滤	98.7±0.88 87.5±4.05~96.9±2.05	39.4±8.91 57.8±8.45	Tsunematsu ^[2]
纱布过滤	72.3	47	Lycke et al. ^[3]
离 心	90.0	30	
离心后加抗小白鼠腹腔细胞血清	99.9	40~50	Takeuchi ^[4]
梯度离心	>99.0	70	Mashi et al. ^[5]
纤维素粉过滤	>99.9	80	Tanabe et al. ^[6]
绿脓杆菌溶血素	100		Tryon et al. ^[7]
胰蛋白酶消化法	98.7	194.4	本文作者

1980—1981 年,用未净化的感染鼠腹腔渗出物制备的 17 批抗原中,有 4 批产生非特异性凝集;用净化的弓形虫速殖子制备的 19 批抗原,则均未出现非特异性凝集。

讨 论

1. 胰蛋白酶 2 次消化能很好地消化感染鼠腹腔渗出物中的腹腔细胞和炎性细胞,而对弓形虫速殖子无破坏作用,因而能去除腹腔细胞,达到分离纯净弓形虫速殖子的目的。由于腹腔细胞被消化,其中存在的弓形虫速殖子被释放出来,故游离虫体的回收率非但不降低,反有所增加。与国外的方法比较,胰蛋白酶消化法简便易行,同样可去除绝大部分腹腔细胞,而虫体回收率大大提高(见表 4)。

弓形虫速殖子经胰蛋白酶消化后仍保持对小白鼠的致病力接种经洗涤的腹腔渗出物和净化的弓形虫速殖子的小白鼠,比接种感染鼠腹腔渗出物原液的延迟 2 天死亡,此种现象可能与腹水中对小白鼠具有致死性的弓形虫毒素(Toxotoxin)经生理盐水多次洗涤而去除有关^[8]。

用胰蛋白酶消化法净化的弓形虫速殖子制备间接血凝试验抗原,其抗原浓度可提高,而且可能由于抗原纯度提高,减少了非特异性凝集的产生。

参 考 文 献

- [1] Fulton JD et al.: *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 51: 123, 1957.
- [2] Tsunematsu Y.: *Am J Trop Med Hyg* 9: 556, 1960.