

柔嫩艾美耳球虫各阶段虫体纯化方法的改进*

蒋建林 蒋金书

(中国农业大学动物医学院,北京 100094)

摘要: 本文报道了改进的柔嫩艾美耳球虫各阶段虫体纯化方法。用胃蛋白酶消化盲肠道组织,铜筛过滤除去大颗粒杂质后,以 $1.1 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蔗糖离心漂浮卵囊,然后用小于 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蔗糖溶液反复漂洗,最后以 5% 次氯酸钠消毒处理,获得了大量纯化柔嫩艾美耳球虫卵囊。孢子化卵囊经研磨,消化,游离出孢子后,过 DEAE-纤维素 52 层析柱,以 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ Tris-HCl, (pH=8.0, $0.15 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaCl) 洗脱,层析柱高 5 cm,洗脱液水柱高 3 cm,流速为 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,纯化出了孢子。取人工感染球虫鸡的 120 h 后的盲肠,游离出第二代裂殖子,铜筛过滤后,过柱方法同前,纯化出了第二代裂殖子。结果证明本法分离的孢子和第二代裂殖子活性好,回收率达 87%。

关键词: DEAE-纤维素 52 柱层析; 柔嫩艾美耳球虫; 卵囊; 孢子; 第二代裂殖子

中图分类号: S852.723

要对鸡球虫孢子和第二代裂殖子进行免疫学、生物化学及组织培养等研究,首先就必须纯化出大量的虫体。前人已报道许多纯化的方法,一种方法是利用比重的差异来纯化,如不连续梯度离心法^[1~4],离心淘洗法^[5],但都无法除去那些与孢子或裂殖子比重相近或相等的杂质,回收率低,就连比较好的离心淘洗法回收率也只有 50%~60%^[6];另一种方法是用酶消化肠内容,再简单离心和过滤除去杂质来纯化裂殖子^[7],但该方法也很难保证获得纯的裂殖子,也很难保证虫体表面一些物质不被酶消化掉。近年来一些学者利用层析法纯化孢子、裂殖子,如用合成纤维^[8],玻璃珠^[9]作层析剂纯化出了柔嫩艾美耳球虫的孢子,但该方法的回收率低^[6],况且这些层析剂也不易购置。目前大多采用 DEAE-纤维素 52 柱层析法来纯化球虫的孢子和裂殖子。田广孚等^[10]用甘氨酸缓冲液作洗脱液纯化出了 *E. tenella* 孢子,但纯化时要保持温度,操作复杂;Schmatz 等^[6]用磷酸缓冲液纯化出了 *E. tenella* 孢子,但没有报道是否也可以用来纯化裂殖子。本文用 DEAE-纤维素 52 作层析剂,以阴离子交换剂的最适洗脱液纯化出了柔嫩艾美耳球虫的孢子和第二代裂殖子,并探讨了其纯化原理。

1 材料和方法

1.1 试剂

1.1.1 DEAE-纤维素 52 (Whatman 公司生产) 按常规方法预处理,用洗脱液浸泡平衡待用。

1.1.2 洗脱液 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ Tris-HCl, pH=8.0, 含 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaCl。

1.1.3 消化液 汉克斯盐平衡液(HBSS)中含 0.25%胰蛋白酶(Sigma 公司生产),4%牛

磺胆酸盐(Sigma公司生产),10 000 U/mL青霉素G(Sigma公司生产),10 000 U/mL链霉素(Sigma公司生产)。

1.1.4 伊红染色液 0.1 g 伊红 Y,0.425 g NaCl,用去离子水定溶至 50 mL。

1.2 卵囊的纯化 5×10^4 个柔嫩艾美耳球虫/只(北京株,由中国农业大学动物医学院寄生虫学教研室提供)经口感染2周龄的无球虫鸡,8 d后扑杀感染鸡,取其盲肠用组织粉碎机粉碎,按 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 量加入胃蛋白酶(ICN公司生产),将pH调至2.0,在39℃下消化1 h,使卵囊分散游离出来,再依次用200目、300目和400目铜筛过滤,滤液经 $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min^{-1} 离心沉淀,去掉上清液,在沉淀中加入 $1.1 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蔗糖溶液,再以 $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,离心管上层飘浮的白色似“塞子”状物质即为卵囊,将其移入小于 $0.5 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蔗糖溶液中, $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心10 min沉淀,重复几次充分洗涤除去比重比卵囊小的杂质,然后加入5%次氯酸钠(NaOCl),在4℃下作用10 min,最后在低浓度的蔗糖溶液中离心洗涤,除去小的杂质和NaOCl,即可得到纯化的未孢子化卵囊。将未孢子化卵囊置于2.5%重铬酸钾溶液中,在29℃下通气培养3 d即可得到纯化的孢子化卵囊。保存于4℃下。

1.3 子孢子和第二代裂殖子的纯化

1.3.1 子孢子的纯化 充分洗去纯化的孢子化卵囊溶液中的重铬酸钾,置于组织研磨器中研磨,直到95%以上的卵囊破裂并释出孢子囊为止, $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min沉淀孢子囊,加入消化液于40℃水浴中消化,直到90%以上的子孢子脱囊为止;用洗脱液离心洗涤2次,然后过预先用洗脱液平衡好的DEAE-纤维素52柱,洗脱条件为:层析柱高5 cm,洗脱液水柱高3 cm,流速为 $2 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,收集洗出液即可得纯的子孢子。

1.3.2 第二代裂殖子的纯化 用 5×10^4 个*E. tenella*卵囊/只感染2周龄的无球虫雏鸡。120 h后扑杀感染鸡,取其盲肠,剪成 1 cm^3 大小的小块,置于 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ Tris-HCl, pH=8.0含 $0.15 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaCl溶液中,用磁力搅拌器搅拌,使裂殖子充分游离出来。再依次用200目、300目和400目铜筛过滤,除去盲肠组织块和大的杂质,滤液经 $2\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,红细胞及一些杂质因比重和体积均大,故先沉淀于离心管底,而第二代裂殖子因体积小而后沉淀,于是裂殖子就在离心管沉淀物最上层形成一层“白色沉淀带”,小心取出上层白色沉淀,过DEAE-纤维素52柱,洗脱方法和条件与子孢子纯化相同。经洗脱后即可除去红细胞、细菌及粪渣,收集洗出液即可得到纯的第二代裂殖子。

1.3.3 虫体活率和回收率的情况 虫体活率的情况用活细胞拒抗伊红Y染色法检查。1份细胞悬液加1份伊红染色液,在显微镜下检查虫体活力,活虫体拒抗伊红染色,不着色,且活动力好,死虫体被染成红色,虫体展直不动。虫体回收率的情况用子孢子检查,样品加入到DEAE-纤维素52柱后开始收集洗脱液,前10管每管6.3 mL,后13管改用NaCl浓度线性梯度洗脱液(NaCl浓度从 $0.145 \sim 0.6 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$),每管8 mL,用红细胞计数板计数每管子孢子数量。

2 结果和讨论

一般在纯化卵囊时都采用蔗糖溶液离心法。如蔗糖连续密度梯度离心法^[11],但需要细致的操作和慢启动的离心机;又如离心淘洗法^[5,12],既省时间又方便,并且纯化效果好,但需要特殊的离心机。本实验采用Schmatz等^[6]的方法,并在此法的基础上略加改进。先用胃蛋白酶消化盲肠组织,游离出卵囊,再用孔径大小不同的铜筛过滤除去杂质,之后用 $1.1 \text{ mol} \cdot$

mL⁻¹蔗糖飘浮卵囊,再经小于卵囊密度的蔗糖溶液反复洗涤数次,充分除去小杂质,然后用 5%次氯酸钠漂洗卵囊,最后用小于卵囊密度的蔗糖溶液洗涤数次,就可获得纯净的卵囊(见图 1)。使用本法既容易操作,又不需要特殊的仪器设备,而且纯化的效果更好。

曾报道以甘氨酸缓冲液^[10],磷酸缓冲液^[6]作洗脱液,用 DEAE-纤维素 52 柱纯化 *E. tenella* 子孢子,但都没有报道是否可用于裂殖子的纯化。本文以 DEAE-纤维素 52 阴离子交换剂的最适洗脱液

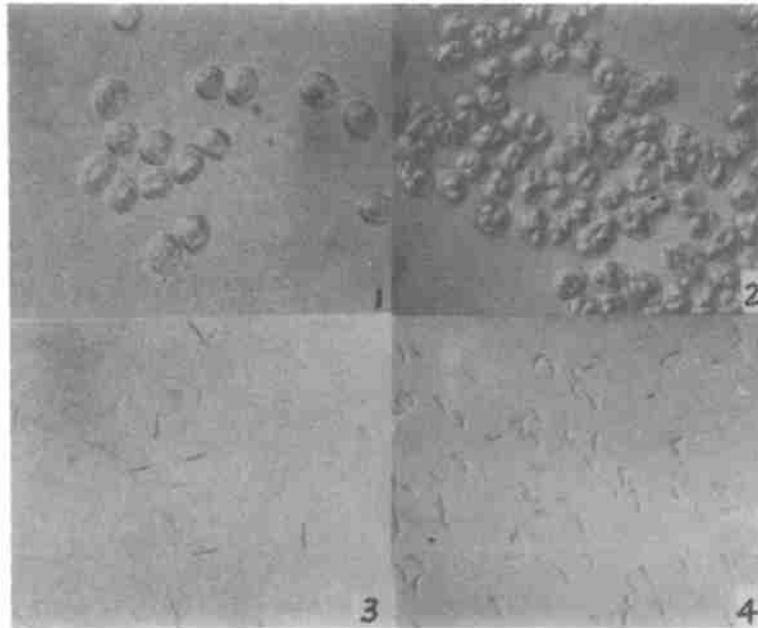


图 1 各阶段虫体的分离

Fig. 1 Purification of parasites

- 1. 未孢子化卵囊 Unsporulated oocysts; 2. 孢子化卵囊 Sporulated oocysts
- 3. 第二代裂殖子 Second generation merozoites; 4. 子孢子 Sporozoites

(0.05 mol·mL⁻¹ Tris-HCl, pH=8.0, 0.15 mol·mL⁻¹ NaCl), 纯化出了子孢子和第二代裂殖子(见图 1)。虫体抗拒伊红和在显微镜的运动证明纯化虫体活性好;回收率达 87%(见图 2),比田广孚等^[10]的方法(回收率 63.4%)高。

DEAE-纤维素 52 柱层析之所以能用来纯化子孢子、裂殖子和一些原虫虫体,可能是离子交换层析剂的离子吸附作用吸附杂质,虫体的运动性挣脱离子吸附和层析剂形成的筛网挡住杂质 3 个因素的共同作用的结果。因此,在用 DEAE-纤维素 52 纯化原虫虫体时,应选用适当的洗脱液,以减少层析剂对虫体的离子吸附作用,又不减弱对杂质的离子吸附作用;还要保持适当的静水压,不使层析剂压得太紧,形成的筛网太小,不利于虫体通过;也还要注

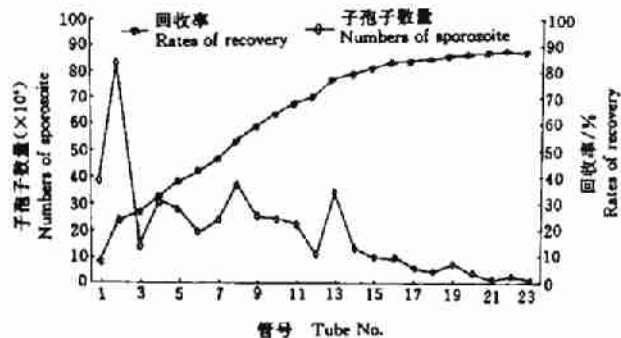


图 2 过柱后子孢子的回收率

Fig. 2 Recovery rate of sporozoites after chromatography
注: 过柱前子孢子总数为 5.1225×10⁶. Total number of sporozoites is 5.1225×10⁶ before chromatography

意保持虫体的活性和运动性,以减弱层析剂的离子吸附作用。

参 考 文 献

- 1 Arrowood M J, et al. Isolation of *Cryptosporidium* oocysts and sporozoites using discontinuous sucrose and isopycnic percoll gradients. J Parasitol, 1987, 73(2):314~319
- 2 Jenkins M C, Dame J B. Identification of immunodominant surface antigens of *Eimeria acervulina* sporozoites and merozoites. M Biochem Parasitol, 1987, 25:155~164
- 3 Wisner M H, Rose M E. The large-scale preparation of purified sporozoites of *Eimeria* spp by metrizamide density-gradient centrifugation. Parasitology, 1984, 88:515~519
- 4 Stotish R L, Wang C C. Preparation and purification of merozoites of *Eimeria tenella*. J Parasitol, 1975, 61(1):700~703
- 5 Stotish R L, et al. Separation of sporozoites, sporocysts and oocysts of *Eimeria tenella* by centrifugal elutriation. J Parasitol, 1977, 63(6):1124~1126
- 6 Xie M Q, et al. A new method for purification of *Eimeria tenella* merozoites. Parasitol Res, 1990, 76: 566~569
- 7 Bontemps M, Yvore P. Technique de purification des suspensions de sporozoites d'*Eimeria* sur colonne des fibres synthetiques. Ann Rech Vet, 1974, 5:109~113
- 8 Wagenbach G E, et al. Purification of *Eimeria tenella* sporozoites with glass bead column. J Parasitol, 1969, 55:833~838
- 9 田广孚, 田增义. 柔嫩艾美耳球虫子孢子的提纯. 中国兽医杂志, 1989, 15 (4):27~28
- 10 Schmatz D M, et al. Purification of *Eimeria* sporozoites by DE-52 anion exchange chromatography. J Protozool, 1984, 31(1):181~183.
- 11 Sharma N N, Reid W M. A cleaning method of coccidial oocysts using density-gradient sedimentation. J Parasitol. 1963, 49:159~160.
- 12 Vetterling J M. Continuous-flow differential density flotation of coccidial oocysts and a comparison with other methods. J Parasitol, 1969, 55(2):412~417

A Improved Method for Purification *Eimeria tenella* Oocysts, Sporozoites and Second Generation Merozoites

Jiang Jianlin Jiang Jinshu

(College of Animal Medicine, CAU, Beijing 100094)

Abstract: The present paper reported the improved methods for purification of *Eimeria tenella* oocysts, sporozoites and second generation merozoites. The ceca containing oocysts was disrupted in disruptor and digested with pepsin; after filtration with different size filters, the primarily purified oocyst fraction was isolated by flotation in $1.1 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ sucrose and this crude material further purified by flotation repeatedly in $< 0.5 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ sucrose; finally, the oocysts were sterilized by incubating in 5% cold NaOCl for 10min. After prepared crude material, the sporozoites and second generation merozoites were further purified by DEAE-cellulose 52 anion exchange chromatography with $0.05 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ Tris-HCl pH = 8.0 buffer, containing $0.15 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaCl. With this method, the sporozoites and merozoites were still alive, and the mean recovery rate of sporozoites and merozoites was about 87%.

Key words: DEAE-cellulose 52 anion exchange chromatography; *Eimeria tenella*; oocysts; sporozoites; merozoites