DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.12.049

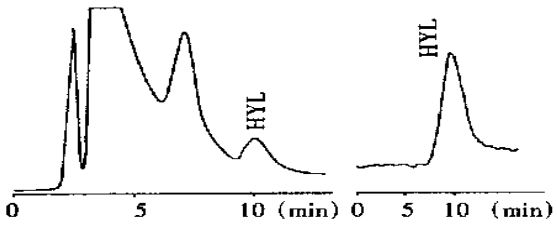


图2 本方法对样品(A)和标准(B)HYL的分析图谱

2.2 HYP、HYL的回收率

将一定量的HYP和HYL标准液分别加入8份样品中，用同样的方法测定，HYP和HYL的回收率结果见表2。

表2 HYP、HYL的回收率

加入量(μg)	HYP		HYL	
	测得量(μg)	回收率(%)	测得量(μg)	回收率(%)
2	2.01	100.50	1.93	96.50
2	1.97	98.50	1.95	95.00
2	1.98	99.50	2.03	101.50
2	1.93	96.50	1.97	98.00
4	3.85	96.25	3.65	91.25
4	3.82	95.50	4.05	94.00
4	3.89	96.25	3.87	95.00
4	3.85	96.25	3.90	97.50
平均		97.53		96.09

2.3 HYP、HYL的重现性

取同一份标本，日内和日间各进样8次，测得HYP、HYL重现性结果见表3。

表3 HYP、HYL重现性试验($n=8$)

化合物	日内		日间	
	测得值	CV(%)	测得值	CV(%)
HYP	30.34±0.27	0.89	40.67±0.52	1.28
HYL	6.39±0.17	2.66	6.03±0.21	3.48

3 讨论

氨基酸分析仪分析氨基酸主要是通过强酸性阳离子交换树脂对氨基的吸附、洗脱、分离来完成的。在氨基酸分析中柱床高度、柱温、洗脱剂的pH值和离子强度等对峰的保留值和分辨率有一定影响，本实验中所用色谱柱为Beckman公司生产的不锈钢专用柱，柱长无法随意改变，因此本实验采用了改变其他几个因素来提高分析速度和分辨率。HYP为酸性氨基酸，比较容易被洗脱，所以我们采用了pH值和离子强度相对较低的洗脱剂Na-A(pH 3.15)和较低的柱温(48 ℃)进行分析，HYP一经洗脱，立即用高pH的再生液再生柱子，将其余氨基酸从柱上洗脱下来，再用Na-A平衡分离柱，以便进入下一次分析。HYL为碱性氨基酸，与树脂结合力强，较难洗脱，因此采用了较高的柱温77 ℃和高pH高离子强度的洗脱剂Na-D(pH 4.25)，它使酸性，中性氨基酸很快被洗脱下来，并堆积在一起，见图2，而HYL则能得较好的分辨率和较快的分析速度，当HYL出峰之后，立即用再生液清洗再生分离柱，然后用Na-D缓冲液平衡分离柱，继续分析下一个样品。根据上述原理建立的胶原特异性氨基酸的快速测定法，缩短了分析时间，重现性好，变异系数小，回收率高，测定结果准确可靠，且操作简便，是胶原特异性氨基酸测定、胶原含量估算的理想方法，可广泛应用于各种胶原样品的HYP和HYL分析。

关键词：胶原；羟脯氨酸(HYP)；羟赖氨酸(HYL)；氨基酸分析仪；快速测定
中图法分类号：Q517 文献标识码：B

参考文献：

[1] Euli D, Colombo L, Brouno A, *et al*. Assay for 5-hydoxylysine and L-lysine in human and rat urine and in bone by gas chromatography[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1999, 724(2): 373—379.
[2] Bank R A, Beekman B, Tenni R, *et al*. Pre-column derivatisation method for the measurement of glycosylated hydroxylysines of collagenous proteins [J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997, 703(1—2): 267—272.
[3] Kondo A, Ishikawa O, Okada K, *et al*. Measurement of histidinohydroxylysinonorleucine and hydroxyproline in skin collagen by reversed-phase high-performance liquid chromatography after 9-fluorenylmethyl chloroformate labeling[J]. Anal Biochem, 1997, 252(2): 255—259.
[4] Jacques L B, Christelle G, Colette C L, *et al*. Amino acid determination in biological fluids by automated ion-exchange chromatography: performance of HitachiL-8500A[J]. Clinical Chemistry, 1997, 43(8): 1 421—1 428.

（编辑 潘式文）

文章编号：1000-5404(2001)12-1486-02

技术方法

约氏疟原虫合子的分离和动合子培养

Isolation of *Plasmodium yoelii* zygotes and its ookinetes cultivation *in vitro*

郝宏兴[1]，苟 俊[2]，张静茹[1]，段建华[1]（第三军医大学：[1]基础医学部病原生物学教研室；[2]高原军事医学系中心实验室；重庆 400038）

提 要：目的 从感染小鼠血液直接分离约氏疟原虫合子，并在体外培养，转化为动合子。方法 体外诱导感染鼠血中的约氏疟原虫雌雄配子形成、受精，采用Ficoll 400-Hypaque密度梯度离心法分离合子，并在MEM培养基中培养。结果 从10～15只感染小鼠血液可分离到10^6数量级的约氏疟原虫合子；在22 ℃条件下，经18～24 h培养有动合子形成。结论 可以直接从感染血中分离到约氏疟原虫合子，所得合子经培养可形成动合子。

作者简介：郝宏兴(1967－)，男，山西省平定县人，博士研究生，讲师，主要从事疟疾方面的研究，发表论文5篇。电话：(023)68752243
收稿日期：2001-01-21；修回日期：2001-05-19

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

疟原虫的实验研究有时需要分离较为纯净的合子。合子是蚊媒吸血后疟原虫雌雄配子在蚊胃内结合形成的虫期, 但从蚊胃分离获得合子比较困难。Kaushal 等[1] 1983 年报道了直接从心脏血分离鸡疟原虫(*Plasmodium gallinaœum*)合子的方法, 为疟原虫蚊期特别是合子和动合子的研究提供了实验材料。我们在鸡疟合子分离方法的基础上, 尝试从小鼠心脏采血, 直接分离约氏疟原虫(*Plasmodium yoelii*)合子获得成功, 分离所得合子在体外培养形成了动合子。

1　材料与方法

1.1　疟原虫与蚊媒

约氏疟原虫 BY265 株, 按血传 5 代后蚊传一代常规保种。斯氏按蚊 Hor 株, 本室常规饲养。

1.2　供血鼠

选蚊传后血传第 3～5 天, 原虫血症 20%～50%、配子体比例 2%～3%的小鼠用于实验。

1.3　主要试剂

Hypaque、Ficoll-400、麦胚凝集素(WGA), 黄尿酸(Xanthurenic acid)均购自 Sigma 公司。

1.4　合子的分离

参照 Kaushal[1] 报道的方法, 一次分离需感染小鼠 10～15 只。

1.4.1　小鼠乙醚麻醉后用肝素化注射器抽取心脏血, 并立即用 50 ml SA 液(Suspended activation solution: 10 mmol/L Tris; 170 mmol/L NaCl; 10 mmol/L 葡萄糖, pH 7.4)稀释。

1.4.2　500× g, 离心 5 min, 沉淀用 15 ml ES 液(Exflagellation solution: 10 mmol/L Tris; 170 mmol/L NaCl; 10 mmol/L 葡萄糖; 25 mmol/L $NaHCO_3$; 0.1 mmol/L 黄尿酸 10% 小鼠血清, pH 8.0～8.2)重悬, 置 22 ℃水浴 30 min。

1.4.3　取 2 体积悬液加 1 体积梯度离心液(10 体积 339 g/L Hypaque + 24 体积 90 g/L Ficoll-400, 调整二者的比例到离心液密度达 1.083～1.087后过滤除菌), 10 000× g, 水平离心 10 min。

1.4.4　轻轻吸取界面层物质, 用 SA 液稀释后 500× g, 5 min, 离心数次, 再加入 10 ml SA 液重悬沉淀, 滴入 1 mg/ml 的 WGA 200 μl 并水平摇动离心管至出现絮状凝聚时竖立放置 10～15 min。

1.4.5　上清用下端嵌塞 1 cm 长玻璃纤维的巴氏管滤过以除去沉淀、收集流出液体加 SA 液, 500× g, 30 s 洗数次, 沉淀用台盼蓝染色, 并在光镜和电镜下观察合子的形态与结构。

1.5　合子的培养

合子用含 15%小牛血清的 MEM 培养基, 在 22 ℃条件下空气培养 22～24 h。

2　结果

重复分离 3 次, 所得合子可达 10^6 数量级, 台盼蓝染色存活率均为 100%, 纯度达 99%以上, 只有少量淋巴细胞没有去除。经 Gimsa 染色, 油镜观察, 合子大小约 4～6 μm, 呈近圆形, 核紫红色, 有的合子胞浆内可见黄色的疟色素见图 1。电镜下合子大小不一, 核一个、多偏位, 胞质内可见一至数个空泡见图 2。合子在 22 ℃条件下经 22～24 h 培养形成了动合子, 但数量很少, 合子转化为动合子的比率不到 1%。培养的动合子发育呈现不同步性, 有逗点状较小的不成熟动合子, 也有腊肠形较大的形态上成熟动合子, Gimsa 染色的动合子其核、疟色素和胞浆形态特点与合子相似见图 3、4。



图 1　约氏疟原虫合子, 可见核与疟色素　(姬姆萨染色× 1 000)
图 2　约氏疟原虫合子, 可见胞浆内空泡、核　(透射电镜× 4000)
图 3　培养的不成熟动合子, 逗号状　(姬姆萨染色× 1 000)
图 4　培养的成熟动合子, 腊肠状　(姬姆萨染色× 1 000)

3　讨论

获得纯净的疟原虫合子是进行蚊期疟原虫培养的基础, 纯净的合子也可作为疟原虫分子生物学, 免疫学等多方面研究工作的材料。探索疟原虫合子培养为动合子的条件和影响因素一方面能增进对疟原虫发育生物学特性的理解, 更重要的是可为阻断疟原虫蚊期生长发育打下基础。鼠疟原虫与鸡疟原虫的比重不同,

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

为摸索合适的分离液密度，我们曾试用人淋巴细胞分离液、鼠淋巴细胞分离液和自配的密度为 1.083～1.087的 Hypaque-Ficoll 400 分离液，证明分离鼠疟原虫合子的分离液比重要大于 1.083，人淋巴细胞分离液的比重偏低，分离时会造成大量合子的丢失。合子的比重与淋巴细胞相近，因此，合子中有少量淋巴细胞的污染，为进一步提高合子的纯度，可考滤先用纤维素柱过滤的方法去除血中的白细胞[2]，然后再经梯度离心法分离可得到纯度更高的疟原虫合子。鸡疟原虫配子体在 ES 液中 10～20 min 内即形成雌雄配子并受精[1]，本实验证明在 22 ℃孵育 30 min，约氏疟原虫配子的形成和受精即可完成。

本实验动合子培养结果显示只有不到 1%的合子能转化为动合子，这可能与分离所得合子的活力受损有关；另外，未受精的雌配子在形态上与合子不可区分，仅从形态上无法知道分离所得合子中未受精的雌配子所占比例，鸡疟原动合子培养时 60%～80%可以转化为动合子[1]，因此，约氏疟原虫动合子的体外培养条件还需探讨，进一步研究影响约氏疟原虫合子发育为动合子的因素很有必要。

关键词：约氏疟原虫；合子；分离；动合子培养
中图法分类号：R382.31 文献标识码：B

参考文献：

[1] Kaushal D C, Carter R, Howard R J, *et al*. Characterization of antigens on mosquito midgut stages of Plasmodium gallnaceum Ⅰ zygote surface antigens [J]. Molecular and Biochemical Parasitology, 1983, 8(1): 53－69.

[2] Ifediba T, Weiss M M, Vanderberg J P. Infectivity of in vitro-formed Plasmodium berghei ookinetes to mosquitoes[J]. J Parasitology, 1982, 68(2): 333－335.

（编辑 薛国文）

技术方法

文章编号：1000-5404(2001)12-1488-02

大鼠中枢神经系统全程连续切片显示神经核团的新方法

A new method of demonstrating nerve nucli of rat whole central nervous system in serial sections

陈德英，蔡文琴，刘建军 （第三军医大学基础医学部组织学与胚胎学教研室，重庆 40038）

提 要：目的 摸索一种简便易行的、显示大鼠中枢神经系统(CNS)神经核团的连续切片制作方法，制作神经生物学教学所需的大鼠 CNS 全程连续切片标本。方法 采用低温速冻、全程连续冰冻切片、0.05%焦油紫(pH 3.0)染色的方法。结果 大鼠 CNS 神经核团及神经元呈紫蓝色，其它细胞胞核呈淡蓝色。结论 低温速冻、全程连续冰冻切片、低浓度焦油紫(pH 3.0)染色方法适用于显示大鼠 CNS 神经核团的全程连续切片标本的制作。

显示大鼠中枢神经系统(Central nervous system, CNS)神经核团的连续切片是神经生物学教学中重要的实习标本，也是相关研究工作中的重要参考。目前国内此类标本极为缺乏。传统的 CNS 连续切片制作方法多为火棉胶切片法[1]，其过程相当繁琐，周期长，难以大量制作。目前连续切片制作涉及某一器官如内耳、乳腺癌等的冰冻[2,3]或石蜡连续切片[4]，有关大鼠 CNS 全程连续切片显示神经核团的方法鲜见报道。本研究采用低温速冻、冰冻切片、焦油紫染色方法制作显示大鼠 CNS 神经核团的全程连续切片，取得满意效果。

1 材料与方法

1.1 动物来源与取材制片

健康成年 Wistar 大鼠(学校实验动物中心提供)25 只，重约 250 g，雌雄不拘，分为石蜡切片组、火棉胶切片组、冰冻切片组各 5 只和低温速冻冰冻切片组 10 只。

1%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后开胸左心室插管，生理盐水灌流冲洗，继以 10%Formalin 灌流固定。取嗅脑至脊髓腰膨大全程标本 10%Formalin 后固定 4 ℃，2 d。分切为 0.5 cm 长的小段。按 4 个分组分别进行固定后处理：常规石蜡包埋切片；常规火棉胶包埋切片；常规冰冻切片组和低温冰箱速冻后冰冻切片组入 30%蔗糖，4 ℃，3 d。切片前速冻组将标本于－70 ℃低温冰箱速冻 10～15 min 恒冷箱连续冰冻切片，片厚 30 μm。蛋白甘油处理的洁净载玻片隔张连续贴片。一个大鼠 CNS 标本做成两套相应的连续切片，自然晾干。

1.2 染色方法

石蜡切片与火棉胶切片按常规分别进行硫堇、焦油紫染色。

冰冻切片入蒸馏水，从 70%酒精开始上行至无水酒精脱脂，再下行返回各级酒精 20 min，入蒸馏水 30 min，2 次；分别进行硫堇和 0.05%焦油紫醋酸水溶液(pH 3.0)染色；70%酒精分色数秒，镜检至神经元尼氏体清晰，蒸馏水速洗；室温自然干燥，无水酒精脱水，二甲苯透明，DPX 封片。

2 结果

石蜡切片组未取得 30 μm 厚连续切片；火棉胶切片组也未取得满意切片；常规冰冻切片组神经核团结构显示不好；低温速冻冰冻切片组共制作大鼠 CNS 全程连续切片标本 6 套，每套标本约 1 000 片，裱于约 100 张载玻片上。

基金项目：世行贷款资助"21 世纪初高等教育教学改革项目"(B1303)
作者简介：陈德英(1964－)，女，重庆市人，实验师，主要从事组织学与神经生物学常规技术方面的研究。电话：(023)68752229
收稿日期：2001-04-12；修回日期：2001-06-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net