

短膜虫的直接克隆^①

武文杰

(厦门大学寄生动物研究室 厦门 361005)

摘要 对短膜虫的直接克隆方法进行探索. 利用此方法, 对熊蜂短膜虫直接克隆的最高成功率可达 100%, 两周左右的时间能够建立起克隆, 可以应用于对短膜虫自然种群的研究.

关键词 短膜虫, 直接克隆

中国图书分类号 Q 18

短膜虫属于锥虫亚目 (Trypanosomatina) 短膜虫属 (*Crithidia*), 全部为昆虫肠道寄生原虫. 其形态特点是, 只具锥虫亚目六个发育期中的无鞭毛期和前鞭毛期两个发育期, 前鞭毛期为肠道寄生期, 无鞭毛期为随昆虫粪便排出的感染期^[1].

Tibayrenc & Ayala^[2]利用几种不同的生化指标, 对原虫种群结构分析结果显示: 原虫的自然种群 (特别是被不同地理区域或不同宿主长期分离的原虫) 是由少数基因型的克隆所形成的, 这些基因型具有高度的增殖成功率. 他们的结果提示, 在有关寄生原虫的研究中, 克隆应作为工作指标之一^[3].

研究自然种群原虫克隆, 需要对自然界的原虫克隆. 但目前主要是利用已在实验室内建立起虫落的原虫进行的, 不能反映组成自然种群的克隆结构, 为此, 作者对直接克隆自然感染的短膜虫的方法进行了探索, 成功地对自然感染的短膜虫进行了克隆.

表 1 Mattei 培养液配方^{a)}

Tab. 1 The receipt of Mattei medium

成 分	含 量 (g)
NaCl	4.0
KCl	0.4
Na_2HPO_4	8.0
葡萄糖	2.0
Tryptose (Difco)	10.0
Liver Infusion Broth (Difco)	2.0
蒸馏水	1.0 L

a) 使用时加入胎牛血清和庆大霉素

1 短膜虫的直接克隆

1.1 培养液

采用 Mattei 培养液, 配方见表 1 (Brun, 个人交流). 培养液经 120℃ 15 min 灭菌后, 在 4℃ 保存, 使用时加入 25% 胎牛血清 (FBS) 10⁻² g/L 庆大霉素. 胎牛血清应灭活, 如果使用的胎牛血清为非灭活胎牛血清, 可在 57℃ 经 30 min 灭活. 庆大霉素可用蒸馏水配制成 2 g/L 溶液, 经 0.2μ 注射过滤器过滤后, 在 -20℃ 保存.

^① 本文 1995-11-07 收到

1.2 克隆工具

无菌操作台、相差显微镜、灭菌锅、天平、离心机、恒温培养箱、96孔克隆板、克隆针。克隆针可利用回形针制作,其方法是将回形针制成图1所示的形状,将一端的顶部磨尖。

1.3 克隆

1) 配制培养液: 培养液含 75% Mattei培养液, 25% FBS 10^{-2} g/L 庆大霉素。

2) 短膜虫的分离: 将粪便中查有短膜虫的昆虫宿主在零下温度冷冻麻醉 (-20°C 约 10 min), 将宿主置于 70% 乙醇中消毒 10 min, 然后在无菌操作台上凉干。同时将几片载玻片也用 70% 乙醇消毒, 凉干。将昆虫宿主置于一消毒过的载玻片上, 在另一载玻片上分开滴两滴培养液。用火烧杀菌过的镊子将宿主腹部拉开, 取出肠道。将肠道放在另一载玻片上的一滴培养液中冲洗, 然后转到另一滴培养液中切碎。将切碎的肠道吸入含 5 mL 培养液的无菌离心管中, 20 g 离心 10 min, 此时肠道碎片沉入底部, 将上部分 4.5 mL 培养液移入另一离心管, 再次以 1500 g 离心 10 min, 这时短膜虫沉入底部, 抛去上清液, 便得分离的短膜虫。

3) 克隆板准备: 将 96孔克隆板四周边缘的孔注入 $200\mu\text{L}$ 灭菌蒸馏水, 以保持克隆板内的湿度。其余的孔延边缘注入 $15\mu\text{L}$ 培养液, 以保持克隆孔内湿度, 这些孔将用于克隆。

4) 配制短膜虫稀释液: 将离心获得的部分短膜虫转入一无菌瓶内, 用培养液一边稀释, 一边用克隆针点一滴稀释液于克隆板中已注入 $15\mu\text{L}$ 培养液的克隆孔中央, 在相差显微镜下检查, 直至所点的每滴短膜虫稀释液大部分只含一个短膜虫为止, 这时得到的短膜虫稀释液将用于克隆。

5) 克隆: 将克隆针在火上灭菌, 用克隆针在克隆板的每个用于克隆的孔的中央点入一滴短膜虫稀释液, 切勿接触孔边缘培养液。将克隆板盖上, 在相差显微镜下检查, 将那些短膜虫稀释液中只含有一个短膜虫的孔用笔作上标记(在点短膜虫稀释液的过程中, 可以随时在相差显微镜下检查, 以便调整稀释液的浓度)。然后用胶带纸将克隆板四周密封, 放入培养箱 $33\sim 35^{\circ}\text{C}$ 培养。观察短膜虫的分裂状况, 一般 3 d 后将标记的每孔加入 $15\mu\text{L}$ 培养液, 然后根据短

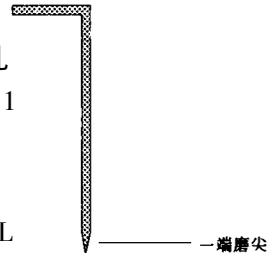


图1 利用回形针制做克隆针
Fig. 1 Making cloning stamp

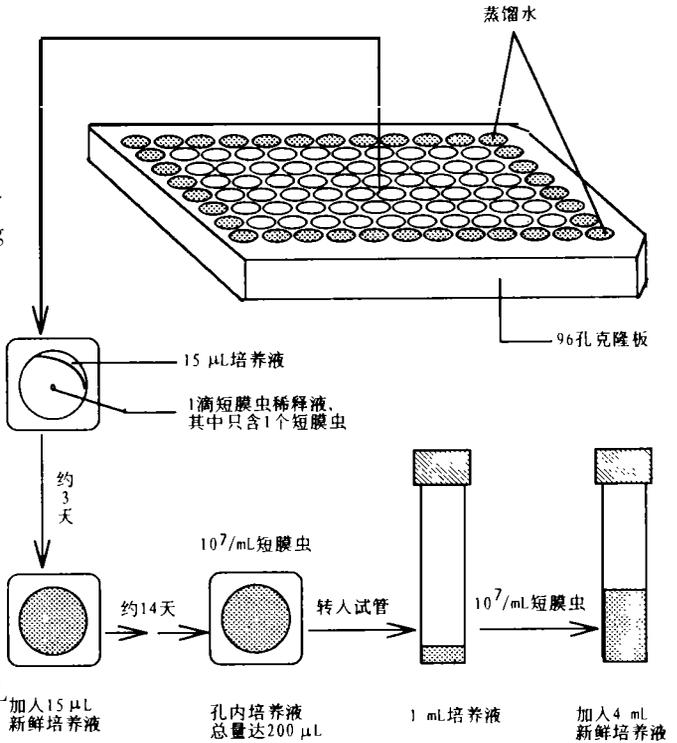


图2 克隆短膜虫步骤
Fig. 2 The steps of direct cloning of Crithidia

膜虫的分裂状况,不断加入少许培养液,直至孔内的培养液总量为 $200\mu\text{L}$ 。当孔内 $200\mu\text{L}$ 培养液短膜虫密度增殖为 $10^7/\text{mL}$ 时,将短膜虫培养液移到试管中,并加入 1 mL 新鲜培养液,继续培养至短膜虫密度 $10^7/\text{mL}$,再加入 4 mL 新鲜培养液培养,此时便得短膜虫的克隆(图 2)。

2 短膜虫的保存

1) 短期保存: 经过实验发现^[4],短膜虫可直接由培养箱移到冰箱 4°C 保存,此时短膜虫的密度最好为 $10^7/\text{mL}$,保存期可达 2~3 个月。再培养时,可将保存的短膜虫培养液离心后,加入新鲜培养液。也可直接接种,接种密度为 $10^5/\text{mL}$ 。

2) 长期保存: 将总量约 10^8 的短膜虫 1500 g 离心 10 min ,抛去上清液,加入 3 mL 新鲜培养液(含 15% FBS $10^{-2}\text{ g}/\text{mL}$ 庆大霉素以及 10% 甘油作为保护剂),分三份转入冷冻细胞保存管。 4°C 预冷 30 min ,移入干冰或液氮面上冷冻 10 min ,然后在液氮内保存。再培养时,将保存管从液氮内取出,放入 37°C 温水浴中融化,直接接种到 5 mL 培养液中。若培养效果不好,可将冷藏的短膜虫 1500 g 离心 10 min ,抛去上清液(内含甘油),加入 5 mL 新鲜培养液培养。

3 克隆过程中常见的问题及解决办法

克隆过程中常见的问题是操作时的污染及昆虫肠道中与短膜虫共生细菌及真菌的污染。

1) 操作时应注意各种工具的消毒以及手的消毒。

2) 与短膜虫共生的细菌,

通过离心可以分离出大部分,剩余的细菌一般在培养液中加入 $10^{-2}\text{ g}/\text{mL}$ 庆大霉素便能够完全抑制其生长,如果效果不好,也可以适量加大庆大霉素量。

3) 与短膜虫共生的真菌,其个体大小与短膜虫相似,用离心法,难以将它们与短膜虫分离,用抗真菌剂往往首先抑制短膜虫的生长。此情况下,可将短膜虫稀释液再稀释再克隆,通过适当的稀释避免真菌与短膜虫在同一克隆孔内。

用上法,作者对熊蜂短膜虫 (*Crithidia bombi*) 直接克隆,成功率达 $61.3\% \sim 100\%$ (图 3)。

4 讨论

有关寄生虫及其宿主的相互关系研究提示,那些比宿主世代很短的寄生虫,对宿主的遗传结构具有选择力,这种选择力对宿主的普遍基因型具有不利的选择^[5,6]。短膜虫具有世代短,在单一宿主体内能够进行多代增殖的特点,被认为是研究有关寄生虫通过负随频选择对遗传变异进行保持的理想材料^[7]。自然界短膜虫的克隆分布,流行状况现在还不清楚,为了能够客

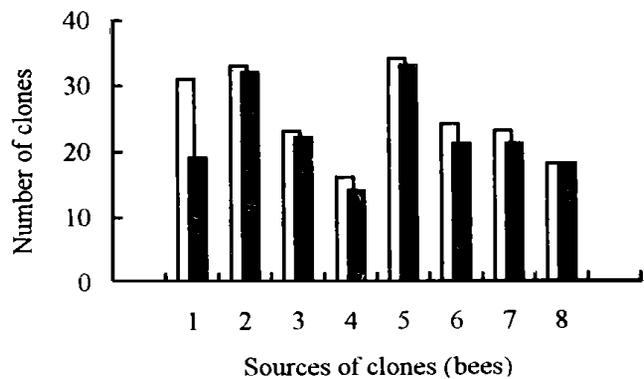


图 3 直接克隆熊蜂短膜虫的成功数

□总克隆数 ■成功数

Fig. 3 The succeed number of direct cloning of *C. bombi*

观真实地反映自然界短膜虫的状态,需要对自然界流行的短膜虫进行直接克隆.短膜虫可以利用多种培养液培养,例如复合培养液^[8]、化学精制培养液^[9],与上述的培养液相比,本实验应用的 Mattei培养液所需成分少,易于在实验室内大量配制.本实验所用 Mattei培养液全部为实验室自己配制.虽然短膜虫在一定的 pH值范围内能够生长增殖,但在直接克隆短膜虫时,发现当培养液的 pH值为 7.0时,更易于进行克隆.

原虫克隆的成功率一般较低^[10].直接从宿主体内分离原虫进行体外克隆,由于寄生原虫对外界环境的不适应,造成克隆的困难.本实验报道的直接克隆短膜虫的方法,成功率较高(见图 3);时间较短,一个短膜虫在两周左右的时间内便能建立起克隆.本方法可以应用于自然界流行的短膜虫克隆的调查研究.

参 考 文 献

- 1 Hoare A C, Wallace G F. Developmental stages of Trypanosomatid flagellates: a New Terminology. *Nature*, 1966, 212: 1385~ 1386
- 2 Tibayrenc M, Ayala F J. Trypanosome cruzi population: more clonal than sexual. *Parasitology Today*, 1987, 3: 189~ 190
- 3 Keymer A E, May R M, Harvey P H. Parasite clones in the wild. *Nature*, 1990, 346: 109~ 110
- 4 Wu W. *Microevolutionary studies on a host-parasite relationship*: [Inauguraldissertation]. Die Bibliothek der Universität Basel, Switzerland, 1994: 15~ 25
- 5 Hamilton W D, Axelrod R, Tanese R. Sexual reproduction as adaptation to resist parasites (a review). *Proc. natl. Acad. Sci. USA*, 1990, 87: 3566~ 3573
- 6 May R M, Anderson R M. Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 1983, 219: 281~ 313
- 7 Shykoff J, Schmid-Hempel P. Parasites and the advantage of genetic variability within social insect colonies. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 1991, 243: 55~ 58
- 8 Goncalves de Lima V M Q, Roiman I, Alves C D S. Comparison of six isoenzymes from 10 species of *Crithidia*. *J. Protozool.*, 1982, 26: 648~ 652
- 9 Roitman C, Roitman I, Azevedo H P. Growth of an insect Trypanosomatid at 37°C in a defined medium. *J. Protozool.*, 1972, 19: 346~ 349
- 10 Soldo T A, Brickson A S. A simple method for plating and cloning ciliates and other protozoa. *J. Protozool.*, 1980, 27: 328~ 331

Direct Cloning of *Crithidia*

Wu Wenjie

(Parasitol. Res. Lab. Xiamen Univ., Xiamen 361005)

Abstract The experiment was carried out on the cloning of *Crithidia* directly out of its hosts so as to study the clonal structure, epidemiology and genetic variance of its natural population. By using the method described in this paper, *Crithidia bombi* was cloned successfully. The success rate could be as high as to 100% and the time for establishment of clones was about two weeks. The results showed that this method could be used for the future studying on the *Crithidia*.

Key words *Crithidia*, Direct cloning