

华东师范大学出版社

沈 郎
沁 所
汶 编
译



寄生原虫和蠕虫的 体外培养

寄生原虫和蠕虫的体外培养

沈沁汶 郎 所 编译

华东师范大学出版社

寄生原虫和蠕虫的体外培养

沈沁汶
郎 所 编译

华东师范大学出版社出版

(上海中山北路3663号)

新华书店上海发行所发行 宜兴南漕印刷厂印刷

开本: 850×1168 1/32 印张: 12.75 字数: 320千字

1987年10月第一版

1987年10月第一次印刷

印数: 1—2500本

统一书号: 13135·036 定价: 2.60元

内 容 提 要

至今,寄生虫学的研究已达到了分子水平,这是和寄生虫体外培养技术获得成功密切相关的。目前既有权权威性又具基础性的寄生虫体外培养著作,要算 Angela E.R.Taylor 和 John R.Baker 主编、由十四位世界知名寄生虫学者所合写的《寄生虫体外培养》。本书的编译者摘译了原书的主要部分,补充了弓形虫、焦虫等类群的培养技术,还增加了一些国内外工作者所取得的最新成就,又结合作者多年教学和科研工作经验,编译成本书。

本书提供了寄生原虫和寄生蠕虫的一些种群在人工培养基、细胞和组织及鸡胚中的培养方法和技术等内容,可用作高等院校寄生虫体外培养课程的教材,供大专院校生物学、动物学和寄生虫学专业的大学生、研究生和教师使用,亦可供从事寄生虫体外培养、防治和药物筛选、免疫、生理生化、生活史等研究的科研人员参考。

ZW04/14

前 言

近年来,在寄生虫学研究领域中,由于体外培养技术的应用,使寄生虫学的研究得到了进一步的发展。为了学习和介绍这一新兴技术,我们在开展寄生虫体外培养研究的基础上,于1982年开设了“寄生虫培养”课程。作为有关大学生和研究生的选修课,同时翻译了 Angela E.R.Taylor和 John R.Baker 主编的《寄生虫体外培养》一书的第二版作为参考教材。该书由十四位世界知名的寄生虫学家合写而成,在寄生虫培养领域中,它是一本既具权威性又有基础性的专著。

经过几年的摸索,在参考教材的基础上,我们又补充了一些国内外最新成就,并结合本校的教学和科研经验,编译成《寄生原虫和蠕虫的体外培养》一书,作为该课程的教材,希望能对从事该课程教学的教师和广大寄生虫学工作者有所帮助。本书的第一章首先叙述了体外培养常用的设备及培养基;第二章——第八章为寄生原虫的体外培养;第九章——第十一章为寄生蠕虫的体外培养。

由于水平限制,在编译过程中,难免存在不足和错误,望读者批评指正。

在编写过程中,承蒙刘家英、葛继志和徐佩娣等同志的帮助,在此一并致谢。

沈沁汶 郎 所 1985年9月

目 录

第一章 体外培养常用的设备及培养基	(1)
第一节 实验室和设备.....	(1)
一、实验室.....	(1)
二、主要设备.....	(3)
第二节 器材的清洗和灭菌.....	(5)
一、玻璃器皿的清洗和灭菌.....	(5)
二、滤器的清洗及灭菌.....	(9)
三、橡皮塞和橡皮管的清洗和灭菌	(12)
四、解剖器械的清洗和灭菌	(13)
第三节 培养用液的制备.....	(13)
一、有机物质培养用液	(13)
二、无机物质培养用液	(15)
第四节 细胞的营养和培养基.....	(18)
一、离体细胞与体内细胞在营养代谢上的差异	(18)
二、细胞的营养	(19)
三、培养基	(24)
第二章 内变形虫、贾第鞭毛虫及毛滴虫的培养	(30)
第一节 内变形虫的培养.....	(30)
一、痢疾变形虫的培养	(30)
二、其它内变形虫的培养	(47)
第二节 贾第鞭毛虫的培养.....	(48)
一、M ₃ 培养基	(49)
二、HSP-1及HSP-2培养基.....	(50)
三、运用TP-S-1培养基的培养.....	(51)
第三节 阴道毛滴虫的培养.....	(53)

一、培养基	(54)
二、培养技术	(60)
第三章 瘤胃内涡形原生动物的培养	(68)
第一节 培养方法	(69)
一、培养用材的准备	(69)
二、培养技术	(72)
第二节 单种原生动物的保持	(75)
一、单棘双涡形虫	(75)
二、五棘双涡形虫	(75)
三、亲和双盾虫	(75)
四、三带甲盾虫	(75)
五、囊形内腰[纤]虫	(76)
六、尖尾内腰[纤]虫	(76)
七、长核内腰[纤]虫	(77)
八、简单内腰[纤]虫	(77)
九、 <i>Epidinium ecaudatum caudatum</i> (牛)	(78)
十、 <i>Epidinium ecaudatum caudatum</i> (羊)	(78)
十一、 <i>Epidinium ecaudatum tricaudatum</i>	(79)
十二、牛单盾涡形虫	(79)
十三、麦琪真双涡形虫	(79)
十四、 <i>Metadinium medium</i>	(79)
十五、尾棘毛头虫	(80)
十六、钝形两叶介壳涡形虫	(80)
十七、多囊复盾虫(包括 <i>Epidinium spp</i>)	(80)
十八、多囊复盾虫(无 <i>Epidinium spp</i>)	(81)
第四章 动基体目原虫的体外培养	(85)
第一节 锥虫的单种培养	(85)
一、成分确定的培养基	(86)
二、复杂培养基	(91)
第二节 利什曼原虫的体外培养	(93)
一、成分确定的培养基	(93)
二、成分半确定的培养基	(95)

三、复杂的培养基	(96)
第三节 唾媒派以外锥虫的培养	(97)
一、成分确定的培养基	(97)
二、成分部分确定的培养基	(99)
三、复杂的培养基	(102)
第四节 唾媒派锥虫的培养	(107)
一、成分确定的培养基	(109)
二、成分半确定的培养基	(110)
三、复杂的培养基	(112)
四、活动锥虫的培养	(114)
五、布鲁氏锥虫血液生活阶段锥鞭毛虫的培养	(115)
六、布氏锥虫的后期锥鞭毛型的培养	(116)
第五章 疟原虫的体外培养	(126)
第一节 红血球阶段的疟原虫培养	(126)
一、无性阶段	(126)
二、配子母细胞的发生	(140)
第二节 孢子生殖阶段的疟原虫培养	(141)
第三节 红血球外期的疟原虫培养	(142)
第四节 其它哺乳类疟原虫的培养	(143)
第六章 焦虫的体外培养	(153)
第一节 培养用淋巴细胞的制备	(153)
一、牛外周血液淋巴细胞(PBL)的分离	(154)
二、用氯化铵分离牛浅黄色复盖层细胞	(154)
三、从少量牛血液中分离外周血淋巴细胞	(155)
第二节 焦虫的体外培养技术	(156)
一、焦虫子孢子的制备(GUTS)	(156)
二、用焦虫的子孢子体外感染牛淋巴细胞	(157)
三、来源于感染动物的泰累氏梨浆虫在体外细胞中的建立	(158)
四、已建立的细胞株的维持	(160)
五、悬液培养	(160)
六、培养物的检验	(161)
第三节 焦虫培养物的冰冻保存	(163)

一、应用DMSO将细胞培养物作冰冻保存·····	(163)
二、应用7.5%甘油冰冻保存孢子·····	(165)
第七章 寄生虫在体外寄主细胞和组织中的生长 ·····	(168)
第一节 寄主细胞的培养方法·····	(169)
一、宿主细胞的培养·····	(169)
二、培养基·····	(179)
三、细胞培养在药物研究中的应用·····	(179)
第二节 球虫在体外寄主细胞和组织中的生长·····	(180)
一、球虫的培养·····	(180)
二、禽艾美球虫的培养·····	(189)
三、其它球虫的培养·····	(192)
第三节 锥虫在体外培养寄主组织和细胞中的生长·····	(193)
一、鞭毛型锥虫的培养·····	(193)
二、无鞭毛型克[鲁斯]氏锥虫的培养·····	(194)
三、细胞内利什曼原虫的培养·····	(195)
第四节 蛲传染寄生虫在体外培养的宿主细胞和 组织中的生长·····	(196)
第五节 疟原虫卵囊在体外组织培养中的发育·····	(197)
第八章 寄生虫在鸡胚中的生长 ·····	(205)
第一节 鸡胚在微生物学研究中的应用·····	(205)
第二节 寄生原生动物在鸡胚中的生长·····	(206)
一、细胞外原生动物在鸡胚中的生长·····	(206)
二、细胞内原生动物在鸡胚中的培养·····	(209)
第三节 接种和培养技术·····	(213)
一、胚胎的来源、贮藏及培育·····	(213)
二、胚胎接种·····	(215)
三、感染材料的制备·····	(218)
四、从蚊虫回收疟原虫的子孢子·····	(219)
五、鸡疟在鸡胚中的传代·····	(220)
六、从感染胚胎中采集尿囊液的方法·····	(220)
第九章 吸虫的培养 ·····	(227)

第一节 裂体科吸虫的培养	(227)
一、曼氏血吸虫的培养	(227)
二、埃及血吸虫的培养	(239)
三、日本血吸虫的培养	(240)
四、羊血吸虫的培养	(243)
五、眼点毛毕吸虫的培养	(243)
第二节 片形科吸虫的培养	(244)
一、肝片吸虫的培养	(244)
二、布氏姜片吸虫的培养	(251)
第三节 鸢形科、复口科、牛首科吸虫的培养	(251)
一、鸢形科吸虫的培养	(251)
二、复口科吸虫的培养	(254)
三、牛首科吸虫的培养	(255)
第四节 棘口科吸虫的培养	(255)
一、 <i>Echinoparyphium serratum</i> 的培养	(255)
二、马来棘口吸虫的培养	(256)
三、细长鞭带吸虫的培养	(257)
第五节 嗜眼科、光口科、同对盘科吸虫的培养	(257)
一、嗜眼科吸虫的培养	(257)
二、光口科吸虫的培养	(258)
三、同对盘科吸虫的培养	(260)
第六节 短咽科、裸茎科、异形科、微茎科等吸虫培养	(261)
一、短咽科吸虫的培养	(261)
二、裸茎科吸虫的培养	(262)
三、异形科吸虫的培养	(263)
四、微茎科吸虫的培养	(265)
第七节 盾腹吸虫、单殖吸虫的培养	(267)
一、盾腹吸虫的培养	(267)
二、单殖吸虫的培养	(268)
第八节 独睾科、隐孔科、后睾科、等睾科吸虫的培养	(269)
一、独睾科吸虫的培养	(269)
二、隐孔科吸虫的培养	(269)

三、后睾科吸虫的培养·····	(270)
四、等睾科吸虫的培养·····	(270)
第十章 绦虫的培养 ·····	(285)
第一节 四吻目绦虫的培养 ·····	(285)
第二节 假叶目绦虫的培养 ·····	(285)
第三节 圆叶目绦虫的培养 ·····	(286)
一、蒙尼绦虫的培养·····	(238)
二、膜壳绦虫的培养·····	(287)
三、中殖孔绦虫的培养·····	(300)
四、带绦虫的培养·····	(304)
五、棘球绦虫的培养·····	(309)
第十一章 动植物寄生线虫的培养 ·····	(321)
第一节 培养基的组成 ·····	(321)
一、血清·····	(322)
二、胚胎浸出汁·····	(322)
三、肝浸汁·····	(322)
四、酵母浸出物·····	(323)
五、蛋白胨·····	(323)
六、合成培养基·····	(323)
七、抗生素·····	(324)
第二节 线虫的培养技术 ·····	(325)
一、线虫的来源·····	(325)
二、接种物的灭菌·····	(326)
三、对接种物的要求·····	(327)
四、培养的物理条件·····	(328)
五、培养的改进·····	(329)
第三节 脊椎动物寄生线虫的培养 ·····	(330)
一、钩虫·····	(330)
二、广州管圆线虫·····	(331)
三、异刺线虫·····	(331)
四、鸡蛔虫·····	(332)
五、猪蛔虫·····	(333)

六、彭亨布鲁线虫和马来布鲁线虫·····	(338)
七、肝毛细线虫·····	(340)
八、羊夏伯特线虫·····	(341)
九、对肠线虫·····	(341)
十、古柏线虫·····	(342)
十一、胎生网尾线虫·····	(344)
十二、血矛线虫·····	(344)
十三、猪圆形线虫属的 <i>Hyostrogylus rubidus</i> ·····	(345)
十四、长后圆线虫·····	(346)
十五、美洲钩虫·····	(346)
十六、细颈线虫·····	(346)
十七、 <i>Nematospiroides dubius</i> ·····	(347)
十八、巴西日圆线虫·····	(347)
十九、结节线虫·····	(350)
廿、奥斯脱线虫·····	(352)
廿一、 <i>Paraspidodera uncinata</i> ·····	(353)
廿二、类圆泥皮线虫·····	(353)
廿三、海豹线虫·····	(354)
廿四、有齿冠尾线虫·····	(354)
廿五、类圆线虫·····	(354)
廿六、鼠烧虫·····	(355)
廿七、 <i>Terranova decipiens</i> ·····	(356)
廿八、吸吮线虫·····	(357)
廿九、犬弓蛔线虫·····	(357)
卅、旋毛虫·····	(357)
卅一、毛圆线虫·····	(358)
卅二、鞭形鞭虫·····	(359)
第四节 无脊椎动物寄生线虫的培养 ·····	(359)
一、以软体动物为宿主的寄生线虫的培养·····	(359)
二、以昆虫为宿主的寄生线虫的培养·····	(359)
第五节 植物寄生线虫的培养 ·····	(363)
一、 <i>Aphelenchus avenae</i> 的培养·····	(363)

- 二、*Aphelenchoides rutgersi* 的培养.....(365)
- 三、虫瘿线虫属的*Meloidogyne incognita*的培养.....(365)

第一章 体外培养常用的设备及培养基

寄生虫体外培养的设备和装置当然要依研究课题和物质条件而定,但不管设备条件的好坏,总的来说要具备如下的几个条件:

- ① 必需满足离体寄生虫生存所必需的条件。
- ② 不受外界微生物污染的环境。
- ③ 要便于清洗和消毒。

第一节 实验室和设备

一、实验室

一般包括准备室、无菌室、恒温培养室和研究室。

(一)准备室

玻璃器皿的清洗、培养物质的准备和消毒灭菌、实验材料的保藏、培养物的固定、染色等工作均在准备室进行,有条件的话,准备室最好分成两间,一间用作实验前的准备和消毒,另一间用作实验后的污物处理和清洗,这样每间各有自己的水槽,干净的东西不致受脏东西的影响。在准备室内必须要具有这样一些设备:盛清洁液的陶瓷缸或玻璃缸(聚氯乙烯盆或桶;镀锌盆;白瓷缸等均可,要求耐腐蚀);玻璃器皿凉干架和贮存柜;烘干和消毒用的电热干燥箱;高压蒸汽消毒锅;蒸馏器(最好玻璃的);真空泵和玻璃水泵;煤气灯;煤气炉或电炉;工作台;污物桶。除上述基本设备外,准备室的工作台面要求能耐酸碱,耐热,房间要求通风和干燥。

对准备室的工作环境要求最好是每天拖洗地面，擦拭工作台面及实验仪器的外壳表面，还可定期（每周或半月）进行熏蒸消毒或喷雾消毒一次，要使准备室处于半无菌状态。另外由于准备室用途多，内容杂乱，必须有妥然管理，并建立严格的保管、使用制度，容纳小件物品的柜子、抽屉应贴明标签，以免混乱。

（二）无菌室

无菌条件的好坏对以后培养的结果有很大的影响，培养操作均需长时间的在无菌室内进行，必须确保无菌的环境。无菌室的组成应包括更衣间、缓冲道和无菌操作室。

1. 更衣间

用作更换无菌工作服、鞋、帽、口罩的地方。此间也应装置紫外灯，可随时进行灭菌。

设置此室的目的是为了避免室外杂菌在工作人员进入时带入无菌室，要求严格时此室设有淋浴间。

2. 缓冲道(室)

此室是为了进一步隔离外界环境，以保证操作室的无菌环境。在缓冲道内工作人员进行手的消毒、携入物的无菌液擦拭，还可临时放置一些实验仪器，使实验在相对无菌条件下即可完成。

一个缓冲道可与2—3个操作间相通。一般更衣间与缓冲道成垂直布局，以减少空气对流而造成外界空气直接进入无菌操作室。

此室亦应装有供消毒用的紫外灯。

3. 无菌操作室

实验的成败在很大程度上取决于无菌室的无菌水平，因此对无菌室的密封程度要求高。操作室不宜过大或过小，可依据用途来设计大小，有时仅以容纳两人对面同时操作即可（教学实验室因供同学学习用，往往需稍大些）。由于操作室内密闭不通风，温湿度和 CO_2 浓度较高，易损害工作人员的健康，最好装置恒温恒湿调节器（空气要过滤）。无菌室的高度一般不超过

2 米,室内装有波长为 $2537\text{\AA}$ °的紫外光杀菌灯以供消毒之用。

无菌室的桌面一般最好不用木头,而用瓷砖或玻璃面,因为在用传染性强的实验材料时,如果不小心倒翻在上面,易于进行彻底的消毒。

无菌室的门应为滚珠滑动的拉门,要易于开闭,以减少灰尘的扬起及污染的机会。

(三)恒温培养室

恒温培养室除要求良好的保温程度外,最好有若干小间以供调控不同的温度,同时应具备半无菌的程度。室内的温度要求均匀,如用电炉加热应用小电风扇使热空气流动均匀。恒温调节器要灵敏可靠,以免温度失调和发生不安全事故。

恒温室内放设置显微镜以便于观察细胞的生长情况,有条件可按置若干台 CO_2 培养箱或隔水式培养箱则更有利于试验与研究工作的成功。

(四)研究室

研究室的设置要根据研究课题的需要进行布置,一般要有实验操作台,便于进行形态观察和进行生物化学测试,有条件时最好要有显微摄影和同位素设备、仪器室、冷库、贮存室等。

二、主要设备

寄生虫体外培养中所用的器械较多,常用的器械设备及其用途如下:

(一) CO_2 培养箱

用于培养寄生虫,可保证寄生虫培养于一定的 CO_2 气相中,也可采用培养皿培养寄生虫。

(二)隔水式培养箱

用于培养寄生虫。

(三)高压蒸气灭菌锅

供培养液、无菌衣等的灭菌。

(四)冰箱

包括普通冰箱和低温冰箱,用于保存某些培养基、试剂及寄生虫的囊蚴、成虫等。

(五)液氮缸

寄生虫保种用。

(六)恒温干燥箱

用于烘烤实验器具。

(七)台天平、普通扭力天平和分析天平

用于培养基及各种试剂成分的称量。

(八)酸度计

用于测试培养液及其它试剂的 pH 值。

(九)恒温水浴箱

用于囊蚴的脱囊及其它保温需要。

(十)细菌过滤器及氮气钢瓶,真空泵

用于减压抽滤酶液、血清、培养液等不能经受高压灭菌的溶液,以达到除菌的目的。

(十一)组织捣碎机

用于捣碎宿主组织,以分离制备寄生虫的囊蚴或虫卵。

(十二)离心机

用于沉淀寄生虫及其它的需要。

(十三)玻璃蒸馏设备

用于制备重蒸馏水。

(十四)手术器械

用于解剖宿主,摘取、剥离和剪碎机体组织和器官。

(十五)血球计数器(板)和手按计数器

用于计算寄生虫数。

(十六)组织培养瓶(管)或培养皿

用作寄生虫的培养器皿。

(十七)解剖镜和显微镜