

沙眼衣原体的简便计数法

关洁 袁鹰 张友逊

(北京市眼科研究所)

目前衣原体的计数,一般采用 Reeve^[1] 的方法,即用姬姆萨液将经过一定处理的衣原体染色,然后在显微镜暗视野下进行计数。该方法步骤较多,耗时长,且易受细胞碎片干扰。Salari^[2] 利用荧光素染料 Hoechst 33258 (Bisbe-

rimide trihydrochloride) 可与衣原体 DNA 结合的原理,建立了衣原体亲核荧光素染色法。我们依据 Reeve 及 Salari 二氏法,建立了衣原体亲核荧光素染色计数法。具体步骤如下:

用 0.01M 磷酸缓冲生理盐水 pH 7.2, 新鲜

配制 H33258 溶液 (10 $\mu\text{g/ml}$)。用此液将纯化的衣原体的原液稀释成约 $1-2 \times 10^{10}$ 个/ml 浓度,置 37°C 水浴保温 10 分钟后,用微量注射器准确吸取 0.4 μl , 均匀涂布在玻片上一个 12.6 mm^2 的圆环内,自然干燥后,在荧光显微镜下进

行计数(激发滤板: uG₁; 吸收滤板: K430)。油镜下的衣原体呈大小匀一, 发有蓝绿色荧光的小点。计数时, 在一个圆环内取上、下、左、右、中间五个不同位置, 每个位置内各数一定面积* 内的衣原体个数, 取平均值按下列公式计算:

$$\begin{aligned} & \frac{\text{圆环面积}(\text{mm}^2) \times \text{计数面积内衣原体平均数} \times \text{稀释倍数}}{\text{计数面积}(\text{mm}^2) \times \text{样品量}(\text{ml})} \\ &= \frac{12.6\text{mm}^2 \times \text{计数面积内衣原体平均数} \times \text{稀释倍数}}{\text{计数面积}(\text{mm}^2) \times 0.0004} \\ &= \frac{\text{计数面积内平均衣原体数}}{\text{计数面积}(\text{mm}^2)} \times 3.15 \times 10^4 \times \text{稀释倍数} \\ &= \text{衣原体数/ml 衣原体原液} \end{aligned}$$

用上述方法比较不同操作者检查同一样品的结果, 两组计数 (每组例数 > 20) 结果无显著性差异 ($P > 0.05$)。同一样品同一操作者隔天重复稀释, 涂片计数, 两组结果亦无显著性差异 ($P > 0.05$)。同一样品涂 20 个圆环计数, 95% 置信区间的实验误差平均为 $\pm 15\%$ 。计数过程中, 光照射较长时间后会出现荧光的减弱, 切断光源或将片子放暗处短时间后即可恢复荧光亮度。

本法操作简便易行, 不受非核物质的干扰, 误差较 Reeve 法小 (该法误差为 20%)。涂片在

避光处可保存 3—5 天, 配制的荧光素染液于 4°C 放置后涂片仍可计数。故该方法可以作为对衣原体研究的一个辅助手段 (文中 * 用刻有矩形方框的目镜, 事先在与计数时放大倍数相同的镜下用物镜测微器量出该框面积为 0.0075 mm^2)。

参 考 文 献

- [1] Reeve, P. and J. Taverne, : *Nature*, **195**: 923, 1962.
- [2] Salari, S. H. and M. E. Mard, : *J. Clin. Path.*, **32**(11): 1155, 1979.