

Calcofluor White M2R 荧光染色法识别家蚕微孢子虫

刘吉平^{1,2}, 曾 玲²

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广州 510642; 2. 华南农业大学昆虫生态研究室, 广州 510642)

摘要: 本研究探讨应用荧光染色试剂 Calcofluor White M2R 染色鉴别家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis*。结果表明: 在荧光显微镜下可见家蚕微孢子虫孢子被染上强烈的青蓝色荧光, 而寄主组织碎片、病毒、细菌等不被染色。该法是一种快速有效鉴别微孢子虫的方法。

关键词: 家蚕微孢子虫; Calcofluor White M2R; 荧光染色; 识别技术

中图分类号: Q965 文献标识码: A 文章编号: 0454-6296(2007)11-1185-02

Staining and discrimination of *Nosema bombycis* spores with Calcofluor White M2R

LIU Ji-Ping^{1,2}, ZENG Ling² (1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. Laboratory of Insect Ecology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The fluorescent dye Calcofluor White M2R was applied to stain and identify *Nosema bombycis* spores. The results showed that the spores were stained in green-blue fluorescence. With this method it is easy to distinguish microsporidian spores from virus, bacteria and fungus spores.

Key words: *Nosema bombycis*; Calcofluor White M2R; fluorescent staining; diagnosis

荧光染色试剂 Calcofluor White M2R 最早是用来检测裂殖菌类的真菌(Kimura *et al.*, 1966), 并一直在临床上检测人的病原真菌(Monheit *et al.*, 1986), 目前是世界许多医学实验室推崇用来鉴别人和其他哺乳动物的病原微孢子虫的主要荧光染色剂(Undeen and Alger, 1977; Chioralia *et al.*, 1998; Green *et al.*, 2000; Garcia, 2002; Ovcharenko, 2003), 但有关将其用来鉴别昆虫微孢子虫的报道不多。本研究在上述报道的基础上, 探讨该荧光染色试剂在家蚕 *Bombyx mori* 等鳞翅目昆虫微孢子虫染色鉴别应用上的可行性, 以期在蚕桑生产上快速染色鉴别家蚕微孢子虫及其类似物提供实践参考。

1 材料与方法

1.1 试剂

10% KOH 溶液, 10% 甘油; 1% Calcofluor

White M2R 染色液的配制: 取适量的 Calcofluor White M2R (Sigma 公司产品) 染色剂用 pH 7.2 TBS 缓冲液溶解, 使之浓度为 1% (W/V), 然后加适量的 Evan's blue 染料 (Sigma 公司产品, E-2129), 使之浓度为 0.1%。配制好染色液后存储于黑暗处 (室温 26°C ~ 27°C), 备用。

家蚕微孢子虫 *Nosema bombycis* 由本研究室保存和提供。

1.2 方法

取一小滴 (约 10 ~ 20 μ L) 微孢子虫的悬浮液均匀涂布于载玻片上, 然后滴加一小滴 10% KOH 溶液与 10% 甘油混合液 (1:1), 用灭菌牙签于载玻片将两者轻轻混匀; 接着将预先配制好的 1% Calcofluor White M2R 染色液, 用力摇匀后, 经 15 000 \times g 离心 2 min, 去沉淀, 取上清液一小滴滴加到载玻片上, 混匀后, 立即在 600 倍荧光显微镜下观察。

2 结果与讨论

Calcofluor White M2R 染色剂处理微孢子虫后,

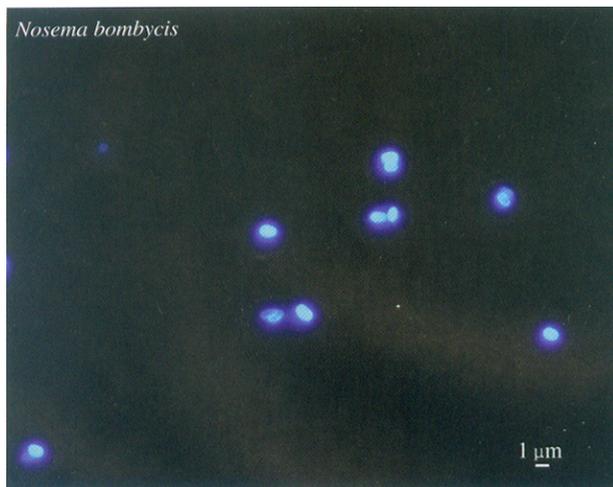


图 1 家蚕微孢子虫孢子被 Calcofluor White M2R 染上青蓝色荧光(600×)

Fig. 1 *Nosema bombycis* spores were stained by Calcofluor White M2R in green-blue fluorescence

Calcofluor White M2R 作为一种荧光增白剂,主要是通过几丁质上的 β -1,4 糖苷键特异结合反应的(Pavenstadt-Grupp and Ruthmann, 1989)。而微孢子虫外壳是不含几丁质的,几丁质主要是在微孢子虫的内壁,Calcofluor White M2R 必须穿透微孢子虫的外壳而染色,因此,染色后荧光相对稳定且较强(Pavenstadt-Grupp and Ruthmann, 1989; Ovcharenko, 2003)。

通过应用 Calcofluor White M2R 荧光染色法,昆虫微孢子虫可以染上强烈的青蓝色或绿蓝色的荧光,而病毒多角体和细菌不被染色,真菌孢子尽管被染色,但荧光相对较弱,且可结合孢子的形态和大小加以区分(Chioralia *et al.*, 1998)即使用低倍的荧光显微镜观测时(200×)(图略)亦可容易辨别出微孢子虫。因此 Calcofluor White M2R 荧光染色技术可以快速有效地区分昆虫微孢子虫与其他病原细菌、真菌和病毒多角体等。

致谢 本研究在英国 Leeds 大学生物学院实验室完成;Calcofluor White M2R 荧光染色剂由 Judith E. Smith 教授提供。

在 600 倍荧光显微镜下可以清晰辨别出染上青蓝色或绿蓝色荧光的孢子(图 1),而寄主组织碎片、病毒、细菌等不被染色(图略),从而判定微孢子虫的存在与否。

参考文献 (References)

- Chioralia G, Trammer T, Kampen H, Seitz H, 1998. Relevant criteria for detecting microsporidia in stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 36 (8): 2 279 - 2 283.
- Garcia IS, 2002. Laboratory identification of the microsporidia. *J. Clin. Microbiol.*, 40(6): 1 892 - 1 901.
- Green LC, LeBlanc PJ, Didier ES, 2000. Discrimination between viable and dead *Encephalitozoon cuniculi* (Microsporidian) spores by dual staining with SYTOX Green and Calcofluor White M2R. *J. Clin. Microbiol.*, 38(10): 3 811 - 3 814.
- Kimura M, Kumagai K, Ishida N, 1966. Staining of schizomycetes with Calcofluor White M2R. (2). Effect on the growth of the fluorescing bacteria. *Nippon Saikingaku Zasshi*, 21(4): 193 - 195. (in Japanese)
- Monheit JG, Brown G, Kott MM, *et al.*, 1986. Calcofluor White detection of fungi in cytopathology. *Am. J. Clin. Pathol.*, 85: 222 - 225.
- Ovcharenko NA, 2003. New and modified methods for studying microsporidia of aquatic animal. *Hydrobiological Journal*, 39(1): 28 - 38.
- Pavenstadt-Grupp I, Ruthmann A, 1989. Microsporidian infection in *Pimpla turionellae* (Ichneumonidae, Hymenoptera): characteristics and reaction with Calcofluor White. *Parasitol. Res.*, 76: 74 - 79.
- Undeen AH, Alger NE, 1977. Agglutination and immunofluorescent tests for infection of mammals by *Nosema algerae* (Cnidospora: Microsporida). *Science of Biology Journal*, 1: 259 - 262.

(责任编辑:黄玲巧)