

家蚕微粒子 (*Nosema bombycis* Nägeli) 孢子的荧光抗体检验技术初报^{*}

郑祥明^{**} 黄自然 卢蕴良

(蚕桑系)

提 要

通常家蚕微粒子病的诊断是依靠光学显微镜检出原虫*Nosema bombycis* Nägeli的孢子。但在感染的初期检出是有一定困难,且对孢子类似物的假阳性也不容易识别。如能及早发现微粒子病而加以淘汰将可大大减少经济上的损失。

本试验应用荧光抗体技术对家蚕微粒子孢子作预知检查。以破碎的微粒子孢子作抗原注射于家兔而获得免疫血清,经硫酸铵盐析,再用异硫氰酸荧光素标记而得到直接法荧光抗体。用羊抗兔(IgG)的荧光免疫球蛋白作第二次染色的染料,则成为间接法检验技术。

当家兔微粒子孢与荧光抗体结合后,在荧光显微镜的黑暗背景上孢子的周缘呈现环状的特异性翠绿荧光。一般以间接法检查为好。

在微粒子病征肉眼未能识别之前,应用荧光抗体技术作预知检验,可从蚕粪或蚕蛹、蛾血淋巴中检出孢子。且可与其它昆虫的微粒子孢子及某些真菌的孢子加以区别。

家蚕微粒子病是蚕业主要病害之一。1870年法国巴斯德博士研究了家蚕微粒子原虫(*Nosema bombycis* Nägeli)的生活史,发现原虫能通过蚕卵而传染子代,因此提出母蛾检验淘汰病卵作为预防措施,沿用一百多年,至今仍然是十分有效的。母蛾微粒子孢子检验技术亦在不断的改革。一方面从数理统计的角度出发,解决抽样理论和实施。如1949年大岛格等^[1]根据二项式定理指出改革抽检方案,废除百分比的计算发病率,获得1951年日本农学奖;1961年又改为二次抽检方案,这些改革既提高了检验的准确率,又大大节约人力物力^[2]。1964年^[3]和1980年,我们亦提出广东省家蚕普通种微粒子孢子检验改革方案,在南海县沙头蚕种场试用,有较好效果(另文发表)。另一方面,从微粒子孢子检验技术出发进行改革,过去沿用普通光学显微镜,后改用相位差显微镜(1968年)^[4],1981年佐藤令一等报道使用荧光抗体技术检验^[5]。1963年,作者等曾用荧光染料识别微粒子孢子。1980年开展本试验,对家蚕蚕期、蛹期的预知检查和微粒子孢子类似物的识别,获得初步成功。简报如下:

- 本文承广东省农科院蚕业研究所刘任贤副研究员以及四川省蚕业制种公司高级农艺师李泽民、东广丝绸公司总农艺师何永棠审阅,表示谢意!
- 现于广东省农科院蚕业研究所工作。

材 料 和 方 法

抗原——家蚕微粒子孢子原虫孢子的处理

家蚕五龄起蚕接种微粒子孢子而获得患病的母蛾，产卵后镜检确有孢子者作为材料，研磨后过滤，离心，收集孢子沉淀物。加入等体积的饱和硫酸铵液，置冰箱4℃，4小时，离心除去蛋白。取上清液，加水20倍稀释，3,000转/分离心10分钟，共洗4次，以除尽硫酸铵，而得纯化孢子。加入无菌水调成 10^{10} 孢子/毫升。按溶液体积加入1/3的细石英砂，在匀浆器中，12,000转/分，处理2至3分钟，静置，取上清液作抗原。

抗血清的制备

用上述抗原1毫升加入等量福氏完全佐剂，充分混合注射于2公斤以上的雄兔。每隔一周一次，共4次，最后测定抗血清效价后采血，按常规法制备抗微粒子孢子血清。

荧光抗体的制备

抗血清经硫酸铵盐析法纯化后得到免疫球蛋白。将异硫氰酸荧光色素 (FITC) 按血清球蛋白量1/80的比例溶于待标抗体体积的1/9 pH9.5碳酸钠缓冲液中；然后加到待标抗体中，调整到pH8.2—8.5，室温下用电磁搅拌器搅拌4小时后，透析，再经葡聚糖凝胶G—50柱过滤收集的荧光抗体浓缩后干冻保存于-20℃。

荧光抗体技术诊断家蚕微粒子孢子

家蚕微粒子孢子或待检物——蚕血、蚕粪及类似物等先作涂抹标本，风干后滴入50%丙酮固定。直接荧光抗体法，即在标本上滴下微粒子孢子荧光抗体，在37℃保湿培育30分钟，用0.01M PBS (pH8.0)冲洗三次，除尽未结合的荧光抗体，风干，加甘油缓冲液封盖。间接荧光抗体法，用上述玻片标本，滴入微粒子孢子抗体，37℃保湿培育30分钟，用上述PBS冲洗3至4次，吸干，滴下羊抗兔IgG荧光抗体（上海生物制品研究所出品），再按同法处理后供作标本。

荧光显微镜 Olympus AH—FL—2 型，激发光源滤片 BG—12，吸收滤片 GG/1.0mm，DG¹/1.5mm；目镜20×，物镜40×。

结 果 与 讨 论

以家蚕微粒子孢子碎片作抗原制备的抗血清效价较用完整孢子为好，抗血清的效价经对流电泳测定，达到1,000倍以上。制备的荧光抗体F/p值为3.1左右，特异性滴度为3。对微粒子具有特异的翠绿色荧光。

家蚕微粒子孢子与荧光抗体结合后，在荧光显微镜下观察。直接荧光抗体法处理，可见整个孢子的表面呈现两个半月形翠绿色的荧光环（图1）。在改变焦点的情况下，可见到孢子中间有2个发特异荧光的小圆点，是孢子的空胞。间接光抗体法处理，见到孢子的形状与直接法处理结果相似，但特异荧光更强烈，由荧光弧组成孢子的

轮廓但边缘并不光滑。只要调整视野的适当明暗度,非特异性荧光是容易排除的。故寄生在家蚕组织或胞内的孢子发出的特异性荧光,亦容易与寄主本身发出少量的非特异性荧光相区别(图2)。

家蚕微粒子病的预知检查

除胚种传染外,经口感染微粒子的病蚕,需经5至7天才能检出孢子。种茧饲养时迫切期待尽早检出病蚕和病蛹,以便及时淘汰,以减少损失。本试验重复多次,采用各龄蚕接种微粒子孢子后4天,取血淋巴涂片,先用普通光学显微镜未能检出孢子的标本,改用荧光抗体技术复检,大多数均能检出孢子。此外,还见到未成熟的孢子(图2)和一些特异性荧光小点(图4),可能是微粒子的游走体(孢子的前体)。取以上病蚕粪,加入0.01M PBS研碎后制成标本,由于桑叶残片很多而妨碍观察,故用普通显微镜未能检出孢子的标本,应用荧光抗体技术同样能检出孢子(图2),此乃其优点之一。因此,应用荧光抗体技术作预知检查,可以提早确诊,有一定的实用价值。

家蚕微粒子孢子类似物的识别

家蚕母蛾检验过程中往往会混入真菌孢子或野外昆虫的微孢子虫孢子,因而造成假阳性。遇到可疑的类似物虽然可以用化学或染色方法区别,但毕竟比较麻烦。用荧光抗体技术检验类似物,效果十分良好。本中试验对下列的类似物进行识别证实,除其小型粒子($2.0 \times 1.0 \mu\text{m}$)略有反应外,其余均不显示特异性翠绿色荧光。见附表。

本文报道了应用荧光抗体技术检验家蚕微粒子孢子获得成功,可以在家蚕微粒子预知检验及母蛾检验时识别孢子类似物,有一定的实用价值,但在生产上应用还有待于改进。试验过程中发现,采用病蛾血液与微粒子孢子抗血清作对流电泳时,出现多一条沉淀带,可能是病蛾血淋巴中某些产物与微粒子抗体有共同原性。我们准备进一步制备家蚕微粒子孢子的酶标抗体,成功的话,可能将对孢子的检验诊断更为有利。

附表 家蚕微粒子孢子类似物的荧光显微镜识别*

家蚕微粒子孢子及类似物	直接法	间接法
家蚕微粒子孢子	+++	+++
家蚕小型微粒子孢子*	+	+
玉米螟	—	—
微粒子孢子	—	—
斜纹夜蛾	—	—
微粒子孢子	—	—
赤僵菌孢子	—	—
黑僵菌孢子	—	—
灰僵菌孢子	—	—

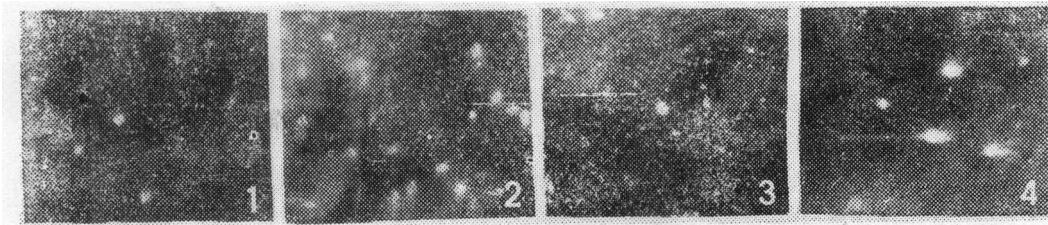
*由南海县沙头蚕种场提供

参考文献

- [1] 大岛格等:家蚕的微粒子病驱除に対する母蛾検査の合理簡素化に関する研究,《蚕丝试验场报告》,13(1)1949,1—16。
- [2] 大岛格等:掃て口の微粒子ガの分布と検査试样抽出法,《应用动物昆虫学杂志》4(4)1960,212。

- 〔3〕 黄自然、卢蕴良: 蓖麻蚕(*Philosamia cynthia ricini*)微孢子虫之研究, 《蓖麻蚕微粒子病文集》, 1963:103—119。
- 〔4〕 渡边静夫: 干涉位相差显微镜にするカイユの微粒子原虫孢子的观察《日本蚕丝学杂志》, 37(6) 1968: 491—497。
- 〔5〕 佐藤令一等: カイユから分离された微孢子虫类孢子的荧光抗体法にする识别《日本蚕丝学杂志》, 50(3) 1981: 180—184。

附图



DETECTION OF THE PEBRINE SPORE, *Nosema bombycis* NAGELI
OF SILKWORM, *Bombyx mori* L. BY FLUORESCENT
ANTIBODY TECHNIQUE

Zheng Xiangming Wong Zeran Lu Yunliang

(Department of Sericulture)

ABSTRACT

Diagnosis of the pebrine, *Nosema bombycis* of silkworm, *Bombyx mori* generally depends on detecting the spore by light microscope. But it is somewhat difficult to detect the spore in the early stage of infection, and it is not so easy to distinguish the pseud spore in the female moth examination. If the pebrine can be selected in time the economic loss will be greatly reduced.

In this experiment, the predictive inspection is made by immuno fluorescent antibody technique. The antigen made of crushed pebrine spore is injected into the rabbit. After the rabbit immuno serum being produced, it is salted out with ammonium sulfate, and labelled with fluorescence isothiocyanate (FITC). Thus the direct fluorescent antibody is prepared. Also the fluorescent antibody of goat (sheep) anti rabbit immuno globulin (IgG) is taken as an indirect fluorescent dye.

when the pebrine spore is combined with the fluorescent antibody, a ring of green fluorescence around the spore is seen on the black ground under the fluorescent microscope (800×). The indirect method is better and more convenient than the direct one. Using the fluorescent antibody technique we can inspect pebrine spore from the feces of silkworm and the haemolymph of larva, pupa and moth before the pathological symptom is found with the naked eye, and can distinguish it from the pebrine spore of other insects (*Ostrinia nubilalis* and *Prodenia litura*) and fungus's spores (*Isaria fumoso-rosea*, *Matarrhizum anisophae* and *Spicaria* sp.).