

# 软化病感染家蚕的碱性磷酸酶活力测定 及病理学研究

李文楚

(华南农业大学 动物科学学院蚕丝科学系, 广东 广州 510642)

**摘要:** 为了研究感染软化病的家蚕碱性磷酸酶(ALKP)的活力并研究酶组织病理学, 通过 ALKP 活力测定证实感染黑胸败血病的软化病家蚕 ALKP 活力变化的规律与正常家蚕相似而单位更低. 石蜡切片显示感病家蚕丝腺组织内充满丝胶类物质, 家蚕吐丝结茧受阻. 用冰冻切片法以 ALKP 反应底物对病蚕的丝腺组织进行活性测定, 显示出感病家蚕的丝腺内外膜均呈现较强的酶反应, 暗示了膜上活跃的磷酸转运系统. 而脂肪体内的某些部位也呈现出点状深着色, 证明脂肪体内含有 ALKP 合成组织.

**关键词:** 家蚕; 软化病; 碱性磷酸酶; 酶组织病理学

中图分类号: S884

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X (2004) 04-0120-03

## Studies on the activities of alkaline phosphatase and pathology of *Bombyx mori* infected with flacherie

LI Wen-chu

(Dept. of Sericulture, College of Animal Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** In order to study the activities of alkaline phosphatase (ALKP) from flacherie infected silkworm and study the enzyme histopathology, the variation pattern of ALKP in the midguts of *Bombyx mori* were examined. It was demonstrated that the silkworm infected with *Bacillus* sp. was similar to that of healthy silkworm but with lower activities. Paraffin wax section of silk gland infected with flacherie showed that the tubes full of sericin-like substances. This obviously obstructed silkworms' spinning in the mounting stage. Cryosectioning technology was applied to determine the activity of ALKP substrate on silk gland. It showed strong reactions on the inner and outer membranes of silk gland from infected silkworms but only weak reactions were observed on the membranes of healthy silkworms indicating active phosphate transportation on the membranes. Intensely stained dots in fat body demonstrated the presence of ALKP synthesizing tissues.

**Key words:** *Bombyx mori*; flacherie; alkaline phosphatase; enzyme histopathology

家蚕软化病是一种对蚕业生产造成非常严重损失的细菌性病害. 近代对该病的发生及防治的研究可以追溯到 20 世纪 60 年代<sup>[1]</sup>, 但蚕业科学工作者对该病的病原存在很长一段时间的困扰, 其中最重要的原因之一是软化病病原和多角体病毒并发, 几乎所有的软化病全都有病毒病伴随. 早期, 蚕业工作者用含有“植物杀菌素”体积分数为 3%~5% 大蒜水浸渍桑叶可有效遏止该病蔓延; 化学药物则主要以红霉素、金霉素与绿霉素的预防防治效果较好<sup>[2]</sup>. 曹诒孙等<sup>[3]</sup>通过对病原的研究, 第一次将软化病 Flacherie 分为细菌性软化病和病毒性软化病.

本文对感病家蚕的中肠组织内的碱性磷酸酶进行了初步的测试, 用冰冻切片技术结合普通石蜡切片等方法对感病家蚕的脂肪体及丝腺细胞进行了酶组织病理学研究, 为有效地了解软化病引起的家蚕的酶组织病理学、生化变化, 防止软化病与病毒病的并发, 提高养蚕经济效益提供可靠的理论依据.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以华南农业大学蚕丝科学系蚕病研究室保存的黑胸败血病 *Bacillus* sp. 作为主要病原. 感病方法: 将

败血病病原活化后稀释至  $10^7 \sim 10^8 \text{ mL}^{-1}$ , 四龄期蚕开始攻毒试验, 均匀喷布于桑叶表面添食. 用蒸馏水作对照. 6 h 后改喂优质桑叶, 使之良桑饱食. 试验材料的收集: 自添食后第 1 d 起各取 1 条病蚕, 置  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  超低温冰箱冷冻作解剖用.

### 1.2 中肠碱性磷酸酶的活力测定

将感病家蚕中肠解剖, 用生理盐水洗去未消化桑叶而保留洗涤上清连同中肠组织一起研磨, 离心, 取上清液作为测定碱性磷酸酶原液. 用碱性磷酸酶孵育液孵育. 孵育液加入少许聚乙烯吡咯烷酮作吸附剂, 室温下孵育反应 25 min 后加入  $0.33 \text{ kg} \cdot \text{L}^{-1}$  TCA 3 mL 终止反应. 以 25 min 内  $D_{425 \text{ nm}}$  的变化与酶原液体积比作为样品的酶活力(以活力单位 U 表示).

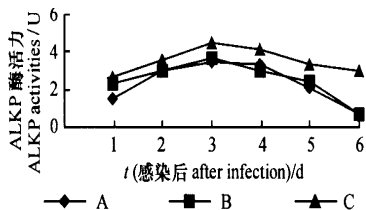
### 1.3 病蚕的丝腺组织切片

从冰箱取出病蚕组织解冻, 解剖丝腺粘附在冰冻切片机床, 设定切片机床温度  $-30 \text{ }^\circ\text{C}$ , 刀片温度  $-2 \text{ }^\circ\text{C}$ , 切片厚度为  $10 \mu\text{m}$ . 切片后用昆虫生理盐水浸泡展开贴在载玻片上, 倒掉生理盐水, 立即加入 NBT/BCIP(SABC)液, 室温孵育 12 h 稍加洗涤, 用 CX-41 显微镜观察病变组织的酶活力. 脂肪体组织的切片、酶活性染色方法同上. 普通石蜡切片法参考[4] 进行.

## 2 结果与分析

### 2.1 中肠组织内碱性磷酸酯酶的活力变化

通过 3 次测试、整理, 得到的中肠碱性磷酸酶活力的变化曲线如图 1 所示. 对照组中肠碱性磷酸酶活性始终维持在一个水准上变化不大, 在四龄期逐渐升高, 五龄中期形成一个活性峰后下降. 感病家蚕中肠碱性磷酸酶总的变化走向与对照类似但活性更低. 该酶活力与家蚕品种、桑叶质量、环境条件等有较大关系[3].



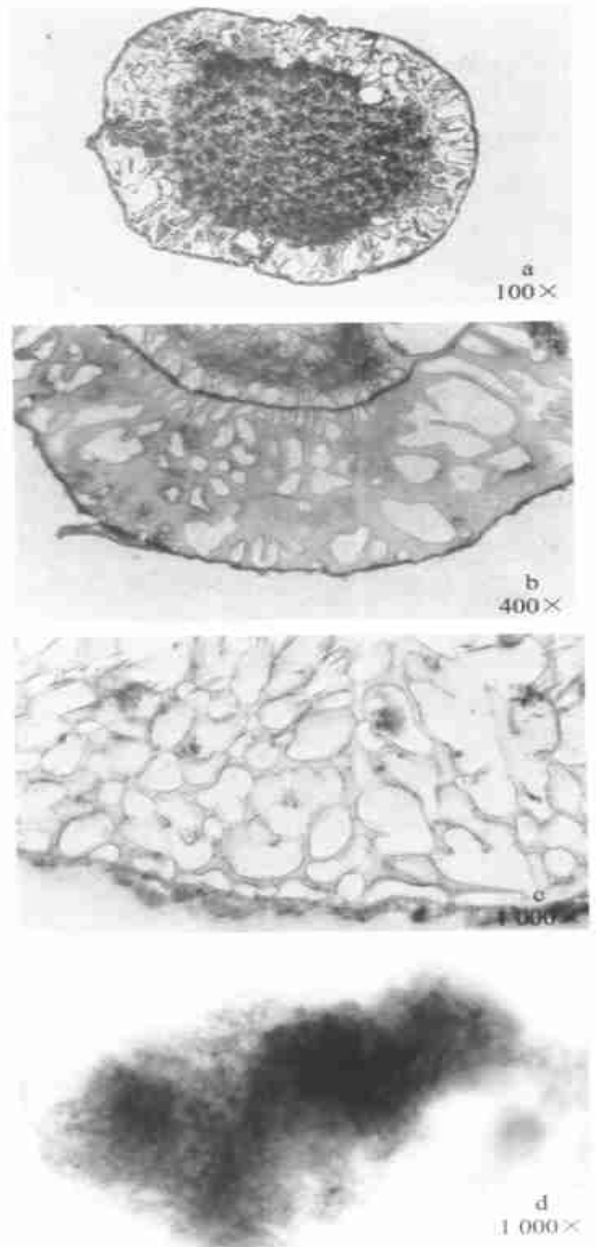
A, B 为感染两种不同败血病的家蚕; C 为添食蒸馏水对照  
A and B indicate the variation curves of AIKP activities in the midguts from *B. mori* infected with two species of flacherie; C is control reared with leaves sprayed distilled water

图 1 感染败血病家蚕中肠组织的碱性磷酸酶活力变化曲线  
Fig. 1 The variation curves of ALKP activities in the midguts from *Banbyx mori* infected with flacherie

### 2.2 感病家蚕的酶组织病理学

因为败血病的感染, 家蚕的各组织器官发生病变, 如图 2. 在石蜡切片中, 可清晰见到病蚕丝腺内

充满网状的丝胶类物质(图 2a), 与正常家蚕[6] 丝腺大不相同.



a 为病变家蚕丝腺的石蜡切片; b c 为 NBT/BCIP 对家蚕丝腺内外膜的染色; c 为放大的正常丝腺的内膜淡着色; d 为病变家蚕脂肪体的点状深着色  
a showed that paraffin wax section of silk gland infected with flacherie; b and c showed that inner and outer membranes of silk gland from infected *B. mori* dyed with NBT/BCIP; c showed that enlarged control of inner membranes faintly stained; d showing intense dot staining of fat body from infected *B. mori*

图 2 感染败血病的家蚕丝腺组织与脂肪体组织的碱性磷酸酶活力分布及丝腺的石蜡切片

Fig. 2 The distributions of ALKP activities on the silk gland and fat body and paraffin wax section of silk gland from falcherie infected *B. mori*

冰冻切片、酶组织反应的微观照片图 2b 显示出病蚕丝腺的内、外膜在碱性磷酸酶底物 NBT/BCIP 的作用下呈现出紫蓝色(400×). 健康家蚕的后部丝腺

对反应底物的活性较低,在显微镜下观察到轻微的淡着色(图2c)。碱性磷酸酶主要位于细胞膜上催化各种醇与酚的磷酸酯水解,又参与磷酸的转运作用,在膜上的作用非常活跃。推定病蚕的丝腺组织为了维持组织的活性,需要比健康家蚕更活跃的磷酸转运及各种催化反应。定量测定如膜内外碱性磷酸酶浓度变化,需要借助流式细胞仪等进行深入研究。

除了血细胞外,家蚕的脂肪体是抵抗病菌、病毒、外源物质入侵蚕体的重要组织器官。本试验对脂肪体在合成碱性磷酸酶中的作用进行了初步的探讨。用NBT/BCIP进行冰冻切片染色试验,显示出脂肪体组织块染色上的不均一,而呈现出点状深着色(图2d)。推测是脂肪体的某些细胞在合成碱性磷酸酶过程中起着重要作用,导致反应底物与酶反应产物不断在这些细胞周围沉集。

本文测定出中肠组织内病蚕碱性磷酸酶活力比健康家蚕的活力低;运用冰冻切片技术与酶反应染

色,观察到丝腺内外膜上酶活力比健康蚕高;脂肪体组织内有碱性磷酸酶的重要合成部位。

参考文献:

- [1] 姚 彬. 家蚕的软化病问题[J]. 蚕业科学通报, 1956, 2: 46-52.
- [2] 中国农业科学院蚕业科学研究所. 红霉素等四种抗菌素对蚕败血病的防治及在蚕血中的存留时间[J]. 蚕业科学通讯, 1960 (2): 98-99.
- [3] 曹诒孙, 王坤荣, 钱元骏, 等. 空头性软化病病原的研究[J]. 蚕业科学, 1963 (1): 36-38.
- [4] 贲长恩, 李淑庚. 组织化学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 272-273.
- [5] 缪云根. 影响家蚕中肠碱性磷酸酶活力的因素[J]. 蚕业科学, 1989 (3): 207-211.
- [6] 吴维光. 家蚕组织解剖学图谱[M]. 北京, 中国农业出版社, 1999. 40-49.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第119页)

### 3 讨论与小结

实验结果表明,水稻品种 IR<sub>36</sub> 甲醇提取物对褐稻虱生物型 II 有忌避性, IR<sub>36</sub> 提取物对其生物型 II 成虫的单向选择性有驱避作用, 对一龄若虫有负作用(导致死亡率增加); 而水稻品种 TN<sub>1</sub> 的提取物对其有引诱作用, 把其喷在 IR<sub>36</sub> 植株上, 成虫的选择率与若虫的死亡率与喷清水或回喷 IR<sub>36</sub> 甲醇提取物的 IR<sub>36</sub> 植株相比均达到差异显著水平。这与 Khan<sup>[3]</sup> 的研究结果是相似的。而 2 个品种的提取物对褐飞虱孟加拉型影响差异不显著。对于水稻品种中存在的对褐飞虱有驱避或引诱作用以及导致褐飞虱死亡的次生物质是哪些化合物及其含量等问题, 还有待今后进一步的研究。

步的研究。

参考文献:

- [1] 陈得利. 水稻不同抗性品种对褐飞虱生物学特性的影响[J]. 福建农学院学报, 1993, 22(2): 168-172.
- [2] 高春先, 贝亚维. 若干粳稻品种抗褐飞虱特征评价[J]. 中国水稻科学, 1992, 6(3): 125-130.
- [3] KHAN Z R, SAXENA R C. Effect of steam distillate extracts of resistant and susceptible rice cultivars on behavior of *Sogatella furcifera* (Homoptera: Delphacidae)[J]. J of Eco Ent, 1986, 79(4): 928-934.
- [4] 朱 麟, 古德祥, 张古忍. 褐飞虱和白背飞虱在抗褐飞虱水稻品种上的行为反应[J]. 植物保护学报, 2002, 29(2): 145-151.

【责任编辑 周志红】