

技术与方法

柞蚕微孢子虫孢子分离纯化方法^{*}

姜义仁^{1,2} 邓真华² 王伯阳² 段玉玺^{1**} 秦利^{2**}

(1. 沈阳农业大学植物保护学院 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学生物科技学院 沈阳 110866)

摘 要 柞蚕微孢子虫病是柞蚕 *Antheraea pernyi* (Guérin-Méneville) 的主要胚胎传染性病害, 病原为柞蚕微孢子虫 *Nosema pernyi* (Wen et Ding), 其病原分离提纯技术研究对于柞蚕微孢子虫病的防治具有重要意义。本文利用差速离心和 Percoll 密度梯度离心法研究了柞蚕微孢子虫孢子的分离纯化方法, 结果表明, 采用不连续密度梯度分离纯化柞蚕微孢子虫孢子的效果比单一浓度的效果好, 以浓度为 25%、50%、75%、100% 不连续梯度, 15 000 r/min 离心 30 min 分离纯化得到的柞蚕微孢子虫孢子纯度高。

关键词 柞蚕, 柞蚕微孢子虫, 分离纯化

Study on the method of separation and purification in *Nosema pernyi*

JIANG Yi-Ren^{1,2} DENG Zhen-Hua² WANG Bo-Yang² DUAN Yu-Xi^{1**} QIN Li^{2**}

(1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. College of Bioscience and Biotechnology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract *Nosema pernyi* (Wen et Ding) is a lethal pathogen caused pebrine disease in *Antheraea pernyi* (Guérin-Méneville). Pebrine disease, which is vertically transmitted, is one of the most harmful diseases of *A. pernyi*. Better information on this disease and its vector are required to prevent outbreaks. This paper compares two methods of separating and purifying the spores of *N. pernyi*; differential centrifugation and Percoll density gradient centrifugation. The results show that discontinuous density gradient centrifugation was superior to single density gradient centrifugation. The purity of spores centrifuged at 15 000 r/min for 30 min under a discontinuous density gradient was 25%, 50%, 75% and 100%.

Key words *Antheraea pernyi*, *Nosema pernyi*, separation and purification

昆虫微孢子虫是害虫生物防治的素材之一, 同时又是泌丝昆虫的重要胚胎传染性病原, 研究其分离纯化技术对于查明昆虫微孢子虫寄生、感染机制及防治技术等具有重要意义。目前分离纯化微孢子虫孢子的常用方法有: 差速离心法、蔗糖(氯化铯)密度梯度离心法和 Percoll 密度梯度离心法。Percoll 密度梯度离心法是目前广泛采用的一种分离纯化方法, 能满足大多数试验的需要。Percoll 是一种有效地微孢子虫孢子的纯化介质 (Jouvenaz, 1981; Fumarola et al., 1982), 本文根据 Percoll 的特性, 以感染柞蚕微孢子虫 *Nosema pernyi*

(Wen et Ding) 的柞蚕 *Antheraea pernyi* (Guérin-Méneville) 成虫为材料研究了单一密度分离、混合加样及不同密度梯度分离的效果, 现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试昆虫 感染柞蚕微孢子虫的病蛾, 由沈阳农业大学柞蚕研究所提供。

1.1.2 药品与试剂

0.15 mol/L NaCl: 称取 0.88 g NaCl, 加少量蒸

* 资助项目: 国家现代农业产业技术体系建设(蚕桑)、辽宁省教育厅科研项目(L2010512)。

** 通讯作者, E-mail: qinli1963@163.com; duanyx6407@163.com

收稿日期: 2010-06-24, 接受日期: 2010-10-20

馏水溶解,定容至 100 mL。

1.5 mol/L NaCl:称取 8.77 g NaCl,加少量蒸馏水溶解,定容至 100 mL。

PBS 缓冲液 (pH 7.8):NaCl 8 g,KCl 0.2 g,Na₂HPO₄ 1.44 g,KH₂PO₄ 0.24 g,双蒸水 800 mL,用盐酸调 pH 至 7.8,定容至 1 L。

Percoll 细胞分离液:密度 1.131 g/mL,pH 9.0 ± 0.5,瑞典 Pharmacia 公司产品,购自北京鼎国生物技术有限公司。

Percoll 不同浓度溶液的配制方法:先用 9 份 Percoll 原液与 1 份 1.5 mol/L NaCl 混合达到生理性渗透压,制成母液,此时溶液为 100% Percoll,然后用 0.15 mol/L NaCl 稀释到所需浓度。

1.2 试验方法

1.2.1 柞蚕微孢子虫的分离

收集患微孢子病的病蛾,去掉翅和头部,组织捣碎匀浆机匀浆,先用单层纱布过滤,再用 4 层纱布过滤,收集滤液,置三角瓶中密封,4℃ 保存。

柞蚕微孢子虫孢子的分离粗提采用如下方法进行,滤液经 500 r/min,离心 1 min,取上清液,再经 3 000 r/min,4℃ 离心 5 min,弃上清,用 PBS 缓冲液悬浮沉淀,再经 3 000 r/min,离心 5 min,重复 5 次,直至上清液澄清为止。离心后弃上清,用生理盐水悬浮沉淀,4℃ 保存备用。

1.2.2 柞蚕微孢子虫的纯化方法

根据 Percoll 特性和文献资料报道 (Jouvenaz DP,1981;朱荣建等,2009) 设计纯化柞蚕微孢子虫方法:

(1) 30% Percoll NaCl 溶液 + 孢子悬浮液 (不混匀),15 000 r/min 离心 30 min。

(2) 50% Percoll NaCl 溶液 + 孢子悬浮液 (不混匀),15 000 r/min 离心 30 min。

(3) 70% Percoll NaCl 溶液 + 孢子悬浮液 (不混匀),15 000 r/min 离心 30 min。

(4) 50% Percoll NaCl 溶液 + 孢子悬浮液 (混匀),15 000 r/min 离心 30 min。

(5) 70% Percoll NaCl 溶液 + 孢子悬浮液 (混匀),15 000 r/min 离心 30 min。

(6) 30%、50%、75% Percoll NaCl 溶液不连续密度梯度离心,4℃,15 000 r/min 离心 30 min。

(7) 25%、50%、75%、100% Percoll NaCl 溶液不连续密度梯度离心,4℃,15 000 r/min 离心 30

min。

Percoll 密度梯度铺制方法:先将最高浓度的 Percoll NaCl 溶液置于离心管底部,然后按浓度由高到低逐渐向上缓慢加入离心液铺制而成,每个浓度梯度加 2 mL 溶液。

加样:用移液枪加样,枪头和离心管成 50°,慢慢将样品沿管壁铺到梯度离心液液面上,样品量 1 mL。

Percoll 密度梯度离心后观察分层现象,用长吸管小心吸取各层溶液置于离心管中,用生理盐水洗涤 3 次,除去 Percoll 液,最后用无菌水悬浮,显微镜检查观察各条带层的微孢子虫情况,采用测量分析软件 ScopePhoto 图像软件拍照。

1.2.3 计数方法

将收集的样品经生理盐水洗涤数次后,用无菌水稀释至适当的倍数,充分摇匀,将溶液滴在血球计数板上,盖上盖片,在 640 倍光学显微镜下观察、计数。

孢子纯净度检查:将收集的各层溶液稀释后用血球计数板分别数孢子数和杂质数,重复 5 次取平均数,计算孢子纯净度。

$$\text{纯净度}(\%) = \frac{\text{孢子数}}{\text{孢子数} + \text{杂质数}} \times 100。$$

2 结果与分析

2.1 Percoll 密度梯度离心效果

Percoll 溶液具有自行分层的特性,样品在单个 Percoll 浓度和非连续密度梯度 Percoll NaCl 溶液中,经 4℃ 15 000 r/min 离心 30 min 后,在离心管中形成明显条带层。

采用单个梯度进行超高速离心后,可见管中明显分成 2 层 (图 1),第 1 层接近液面,第 2 层接近管底。不同 Percoll 浓度其分层效果有一定差异,单个梯度分层效果为 70% > 50% > 30%。从图 1 的 4 号和 5 号管可观察到,采用同一梯度分离纯化柞蚕微孢子虫孢子时,Percoll 溶液和微孢子虫孢子液不混匀,直接用 15 000 r/min 离心 30 min 的纯化效果好,清亮度高,分层明显。

采用 Percoll 不连续密度梯度进行超高速离心后,微孢子虫孢子混合液分成多层 (图 2),采用 3 个梯度 (30%、50%、75%) 的分成 3 层 (3 号管),4 个梯度 (25%、50%、75%、100%) 的分成 4 层 (1 号管)。

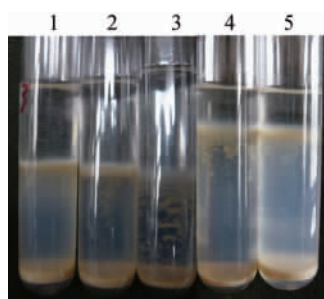


图1 Percoll 单个密度梯度分离效果

Fig.1 Single Percoll density gradient centrifugation image of *Noserana pernyi*

1. 10% Percoll + spores 不混匀; 2. 50% Percoll + spores 不混匀; 3. 30% Percoll + spores 不混匀; 4. 70% Percoll + spores 不混匀; 5. 70% Percoll + spores 不混匀; 1. 70% Percoll don't mixed with spores; 2. 50% Percoll don't mixed with spores; 3. 30% Percoll don't mixed with spores; 4. 70% Percoll mixed with spores; 5. 70% Percoll don't mixed with spores.

2.2 Percoll 密度梯度分离纯化柞蚕微孢子虫孢子效果

2.2.1 Percoll 不连续密度梯度分离纯化柞蚕微孢子虫孢子的显微镜观察结果 样品在不连续密度梯度 Percoll NaCl 溶液中, 经 4℃ 15 000 r/min 离心 30 min 后, 在离心管中形成条带层, 用长吸管由上到下分别吸出置于离心管中, 显微镜观察各层微孢子虫的情况, 用测量分析软件 ScopePhoto 拍照。

采用 30%、50%、75% Percoll 不连续密度梯

度分离纯化柞蚕微孢子虫, 纯化后分成 3 层, 第 1 层含组织碎片和少量孢子, 第 2 层含组织碎片和孢子, 第 3 层(底层)含大量孢子(图 3)。

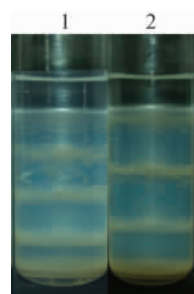


图2 Percoll 不连续密度梯度分离效果

Fig.2 Percoll discontinuous density gradient centrifugation image of *Noserana pernyi*

1. 25%、50%、75%、100% Percoll; 2. 30%、50%、75% Percoll

柞蚕微孢子虫经 25%、50%、75%、100% 不连续 Percoll 梯度离心分离纯化后, 在离心管中形成 4 层明显的条带层, 显微镜观察柞蚕微孢子虫孢子主要集中在 3、4 层, 第 2 层含组织碎片和微孢子虫, 第 1 层无微孢子虫(图 4)。

2.2.2 微孢子虫孢子纯净度检查 微孢子虫孢子纯净度检查结果表明, 采用单个梯度进行超高速离心后均分成两层, 第 2 层的纯净度高于第 1 层, 随着 Percoll 浓度的增大其纯净度提高。相同离心条件下, 30% Percoll 纯化后第 2 层孢子纯净度为 52%, 而 70% Percoll 纯化后其孢子纯净度达到 91.1%。采用同一梯度纯化柞蚕微孢子虫时,

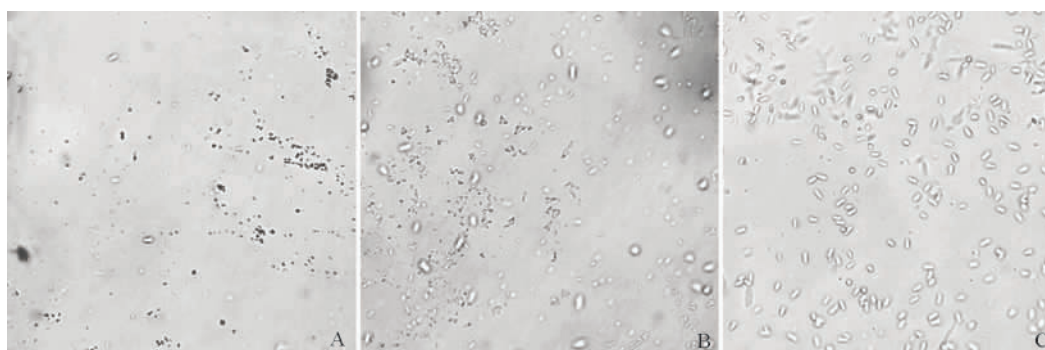


图3 30%、50%、75% 不连续梯度纯化柞蚕微孢子虫各层光镜图(640×)

Fig.3 Microscopy image on purification of *Noserana* using percoll density gradient (30%, 50%, 75%) centrifugation(640×)

A 为第 1 层, B 为第 2 层, C 为第 3 层。

A-the first layer; B-the second layer; C-the third layer.

将 Percoll 溶液与孢子液混匀分离纯化微孢子虫的效果要比 Percoll 溶液与孢子液不混的效果差,其纯净度明显下降,尤其是采用 70% 的梯度纯化时,其纯净度由 91.1% 下降到 65% (表 1)。

在相同的离心转速和离心时间下,采用不连续

密度梯度分离纯化柞蚕微孢子虫效果要比采用单个浓度分离纯化的效果好 (表 1 ~ 3),其中 25%、50%、75%、100% 梯度分离纯化的效果比 30%、50%、75% 的效果好,且纯净度高。靠近管底的条带层柞蚕微孢子虫纯净度达到 91% ~ 95%。

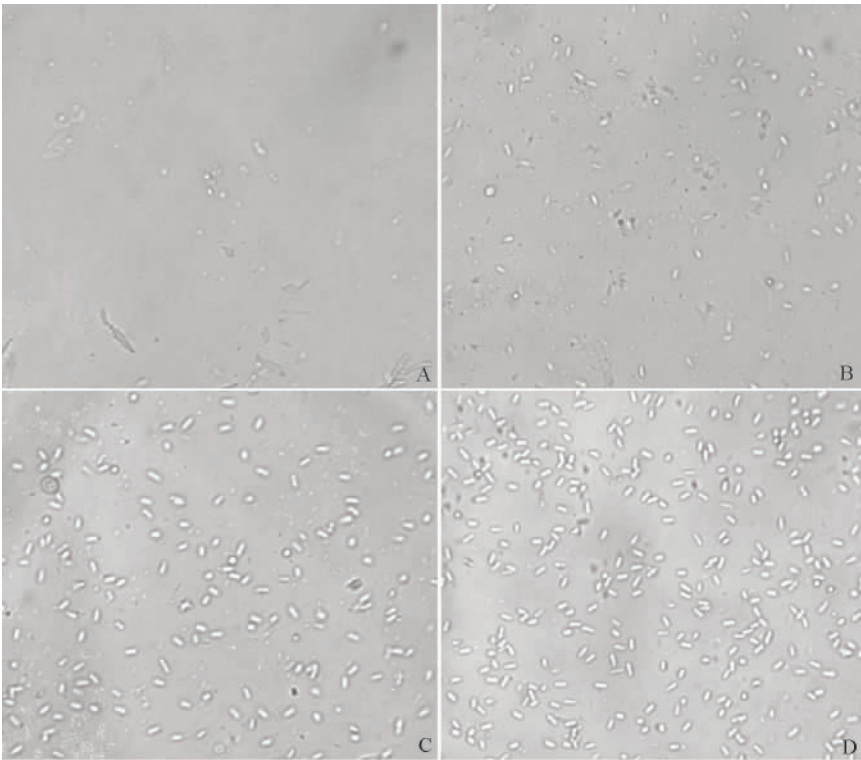


图 4 25%、50%、75%、100% 不连续梯度纯化柞蚕微孢子虫各层光镜图 (640 ×)

Fig.4 Microscopy image on purification of *Nosema pernyi* using percoll density gradient (25% , 50% , 75% , 100%) centrifugation (640 ×)

A 为第 1 层,B 为第 2 层,C 为第 3 层,D 为第 4 层。

A-the first layer; B-the second layer; C-the third layer; D-the fourth layer.

表 1 单个 Percoll 梯度纯化结果				
Table 1 Purification results of spores of <i>Nosema pernyi</i> by single density gradient centrifugation				
Percoll 梯度浓度 Percoll concentration	是否混匀 Mix with spores	取样部位 Samping sites	孢子平均数 Average of spores	杂质平均数 Average of impurity
30%	否 (No)	第 1 层 The first layer	5.6	11.0
		第 2 层 The second layer	8.4	7.8
50%	否 (No)	第 1 层 The first layer	8.8	11.0
		第 2 层 The second layer	13.0	6.4
70%	否 (No)	第 1 层 The first layer	17.4	11.6
		第 2 层 The second layer	10.2	1.0
50%	是 (Yes)	第 1 层 The first layer	2.8	3.0
		第 2 层 The second layer	6.8	4.4
70%	是 (Yes)	第 1 层 The first layer	3.4	2.6
		第 2 层 The second layer	7.4	4.0

表 2 30%、50%、75% 不连续梯度纯化结果
Table 2 Purification results of spores of *Nosema pernyi* by discontinuous gradient centrifugation (30% ,50% ,75%)

取样部位 Sampling sites	孢子平均数 Average of spores	杂质平均数 Average of impurity	纯净度(%) Purity (%)
第 1 层 The first layer	2	8	20.0
第 2 层 The second layer	4	5	44.4
第 3 层 The third layer	112	10	91.8

表 3 25%、50%、75%、100% 不连续梯度纯化结果
Table 3 Purification results of spores of *Nosema pernyi* by discontinuous gradient centrifugation (25% ,50% ,75% ,100%)

取样部位 Sampling sites	孢子平均数 Average of spores	杂质平均数 Average of impurity	纯净度(%) Purity (%)
第 1 层 The first layer	0	9	0
第 2 层 The second layer	50	24	67.6
第 3 层 The third layer	135	10	93.1
第 4 层 The fourth layer	228	12	95.0

3 讨论

采用蔗糖密度梯度离心法和 Percoll 密度梯度离心法对家蚕微孢子虫孢子进行分离纯化,纯化结果显示 Percoll 法纯化效果更好,纯化条件为 25%、50%、75%、100% 的 Percoll 不连续梯度,17 500 r/min 离心 20 min,梯度间形成清晰的条带层,纯净微孢子虫孢子聚集在管底两层(周成等,

2002)。菜蛾变形孢虫孢子的分离纯化以 30%、50%、75% 不连续密度梯度 Percoll NaCl 溶液做介质,密度梯度离心与差速离心相结合可获得纯净孢子(朱荣建等,2009)。

本试验结果表明,Percoll 密度梯度离心法也适用于柞蚕微孢子虫孢子的分离纯化,将差速离心与 Percoll 不连续密度梯度离心纯化方法相结合能够得到较好的效果,纯净度均在 90% 以上,柞蚕微孢子虫孢子的折光性和均一性一致,无组织碎片,可满足关于柞蚕微孢子虫孢子的进一步研究需求。不同密度梯度对柞蚕微孢子虫孢子的分离纯化结果存在差异,相同的条件下,Percoll 4 个梯度(25%、50%、75%、100%)比 3 个梯度(30%、50%、75%)离心 30 min 的分离纯化效果好,得到的微孢子虫纯净度更高。4 个梯度得到的第 3、4 层都含有微孢子虫,推测第 3 层的少量微孢子虫孢子为不成熟的孢子。

本试验选择了 0.15 mol/L 氯化钠作稀释液,选择 15 000 r/min 和 30 min 的离心条件,得到的柞蚕微孢子虫孢子的折光性和均一性一致,无组织碎片。

参考文献(References)

Fumarola D, Antonaci S, Jirillo E, Munno I, Lucivero G, Bonomo L, 1982. Percoll density gradient centrifugation. (An improved method for the enrichment of lymphocyte subsets mediating different activities). *Ric. Clin. Lab.*, 12 (3):485—491.

Jouvenaz DP, 1981. Percoll: an effective medium for cleaning microsporidian spores. *J. Inver. Pat.*, 37(3): 319.

周成,潘国庆,万永继,周泽扬,2002. 家蚕微孢子虫 *N. bombycis* 分离纯化方法的优化. *蚕学通讯*, 22(1):7—9.

朱荣建,唐伟,安楠,2009. 菜蛾变形孢虫孢子分离纯化方法研究. *林业勘查设计*, (1):96—99.