技术与方法

Calcofluor White M2R 与 Sytox Green 双重染色法鉴别蜜蜂微孢子虫*

秦浩然[1,2**] 李继莲[1] 和绍禹[2***] 吴 杰

(1. 农业部授粉昆虫生物学重点实验室 中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093;
2. 云南农业大学 东方蜜蜂研究所 昆明 650201)

摘 要 东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)是一种广泛寄生于东方蜜蜂 *Apis cerana*,西方蜜蜂 *Apis mellifera* 和熊蜂 *Bombus* Latreille 上的寄生虫,对蜜蜂和熊蜂的危害较大,进而影响养蜂业的发展。本实验采用荧光染色试剂 Calcofluor White M2R 与核酸染料 Sytox Green 双重染法来鉴别蜜蜂或熊蜂体内的 *N. ceranae* 及孢子的存活状态。结果得出,在荧光显微镜下可见死孢子被染上黄绿色荧光,活的呈现蓝白色荧光,而寄主细胞、细菌、病毒等不被染色。这是一种快速有效鉴别 *N. ceranae* 及其死活的方法,从而判定蜜蜂或熊蜂体内的微孢子虫在是否具有侵染活性,对微孢子虫的研究及药物防治具有重要作用。

关键词 东方蜜蜂微孢子虫,荧光染色,Calcofluor White M2R,Sytox Green

Detection and identification of *Nosema ceranae* by dual fluorescent staining with Calcofluor White M2R and Sytox Green

QIN Hao-Ran[1,2**] LI Ji-Lian[1] HE Shao-Yu[2***] WU Jie

(1. Key Laboratory of Pollinating Insect Biology of the Ministry of Agriculture, Institute of Apicultural Research, Chinese Academy of Agricultural Science, Xiangshan, Beijing 100093, China; 2. Eastern Bee Research Institute of Yunnan Agricultural University, Heilongtan, Kunming 650201, China)

Abstract *Nosema ceranae* is a microsporidian parasite of *Apis cerana*, *Apis mellifera* and bumblebees that has an adverse effect on pollination, especially of fruits and vegetables, and apiculture. In this study, Calcofluor White M2R and Sytox Green stains were used to discriminate between live and dead *N. ceranae*. The results show that dead *N. ceranae* spores had yellow-green fluorescence whereas live spores fluoresced white - blue. This method allows easy detection and identification of live and dead *N. ceranae* and should therefore contribute to further research on *N. ceranae* and its treatment.

Key words *Nosema ceranae*, fluorescent staining, Calcofluor White M2R, Sytox Green

微孢子虫是一类细胞内专性寄生的单细胞微生物,在分子进化和系统发育的研究中将微孢子虫归属于真菌(万永继和沈佐锐,2005)。它们广泛寄生于脊椎动物和无脊椎动物,是经济昆虫、鱼类、兔类、产毛动物、啮齿类及灵长类的常见致病原(Accoceberry *et al.*,1999)。近年来,东方蜜蜂微孢子虫(*Nosema ceranae*)大肆感染我国主要蜜蜂饲养区,染病蜜蜂消化系统紊乱,工蜂寿命缩短,采集能力下降,进而引发细菌病和病毒病的继发感染,导致群势下降,甚至跨群(Higes *et al.*, 2007, 2009; Naug and Gibbs, 2009)。与此同时,欧洲和美洲许多地区的西方蜜蜂多次因感染

* 资助项目:国际科技合作项目(2009DFA32600)、国家自然基金(30972149,30700606)、农业部公益性行业(农业)科研专项课题(201203080-4)和国家蜂产业技术体系建设专项(CARS-45)。

** E-mail: qinhaoran818@163.com

*** 通讯作者, E-mail: qapis@vip.sina.com

收稿日期:2011-11-10,接受日期:2011-12-16

*N. ceranae*而爆发微孢子虫病,甚至有学者认为 *N. ceranae* 引起蜜蜂蜂群崩溃失调症(CCD)的重要因素(Higes *et al.*, 2006, 2008a; Paxton *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009)。近期国内外学者相继在自然界的熊蜂中也发现有 *N. ceranae*,说明其可感染异源寄主(Plischuk *et al.*, 2009; 陈文锋等, 2010),在熊蜂的工厂化繁育过程中,花粉作为熊蜂的饲料是由蜜蜂采集而来的,而花粉中可能含有 *N. ceranae* (Higes *et al.*, 2008b),这将成为熊蜂繁育、授粉过程中的一个致病隐患。

蜜蜂及熊蜂微孢子虫的检测与鉴定方法通常包括常规生物学方法、分子生物方法、免疫学方法等,传统的光学显微镜检虽然比较方便,但对感染初期和轻度感染的容易漏检,且在显微镜下观察时易被其他病原物所干扰(吴杰等,2010);基于 PCR 技术为基础的分子生物学方法灵敏度高而且技术比较成熟,但费用高且检测周期较长(Higes *et al.*, 2006; Paxton *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009);高灵敏的免疫学方法检测微孢子虫又可能导致高的交叉反应与非特异性反应(Leiro *et al.*, 2002; 李艳红等,2006; 刘锋,2009)。但目前这些方法只能证明寄主体内存在微孢子虫,并不能检测到寄主体内微孢子虫的活性。因此,建立荧光染色鉴定微孢子虫的方法就显得至关重要,而有关荧光染色鉴定蜜蜂及熊蜂微孢子虫的报道并不多,本研究主要探讨 Calcofluor White M2R 与 Sytox Green 2 种染料的双重荧光染色法鉴定 *N. ceranae* 及其死活。通过鉴定 *N. ceranae* 的死活,可确定其是否侵染寄主细胞,感染后寄主体内 *N. ceranae* 数量与寄主病症的关系等,以期为 *N. ceranae* 的防治奠定基础。

1　材料与方法

1.1　东方蜜蜂微孢子虫的提取与纯化

2010 年 12 月份在北京周边地区的西方蜜蜂蜂群中发现大量感染微孢子虫致死的工蜂,将其腹部剪下,用研钵研磨,加入适量生理盐水,通过 100 ~ 150 目分样筛过滤后,差速离心得到微孢子的粗提物。

用 100% 的 Percoll 试剂(中科瑞泰公司分装)对粗提的微孢子虫进行纯化。吸取 40 mL 的 Percoll 细胞分离液加入离心管,将 1 mL 微孢子虫粗体物用移液器轻轻加于 Percoll 细胞分离液的液面。放入高速离心机中,配平后 46 000 × g,4℃,离心 90 min。底层乳白色沉淀物即为纯化的微孢子虫,用上述差速离心方法洗涤带有 Percoll 的纯化物。纯化后的微孢子虫置于 4℃ 冰箱保存备用(刘锋等,2009)。

1.2　Calcofluor White M2R 与 Sytox Green 的染色与观察

吸取微孢子虫纯化物 50 μL,在 PBS 中洗 3 次并重新悬浮微孢子,每 100 μL H_2O 加 50 mmol/L SYTOX Green (invitrogen 公司, S7020) 的酸性染料,室温孵育 30 min。再用蒸馏水洗涤 2 次,吸取 5 μL 的混合液置于载玻片上。载玻片快干的时候迅速用甲醇混合,并用 5 mg/ml 的 Calcofluor White M2R(sigma 公司)染色 5 min,清水冲洗后晾干(Green *et al.*, 2000)。

将载玻片置于 TCS SP5 激光共聚焦荧光显微镜(Leica)上,低倍镜下找到孢子后 40 × 物镜观察,在(485 ± 10) nm 激发光波长下和(405 ± 10) nm 激发光波长下观察孢子的荧光显色与形态特征。每个载玻片上统计 10 个点的孢子。

2　结果与分析

经 Calcofluor White M2R 和 Sytox Green 双重染色后,在 400 倍的显微镜下观察,活的 *N. ceranae* 在(405 ± 10) nm 激发光波长下呈现蓝白色荧光,而寄主组织碎片、病毒、细菌等不被染色,从而判定寄主体内是否存在微孢子虫,而死的微孢子虫在(485 ± 10) nm 激发光波长下呈现黄绿色荧光(表 1)。通过图像软件处理,将同一视野下的死和活的微孢子虫叠加到一张图片上,根据颜色判别孢子(图 1 ~ 3),统计出死和活孢子的数

表 1　Calcofluor White M2R 与 Sytox Green 双重荧光染色后 *Nosema ceranae* 死活的颜色对比

Table 1　The difference of *Nosema ceranae* by dual fluorescent staining with Calcofluor White M2R and Sytox Green

激发光波长 (nm) Excitation-wavelength	荧光核酸染料 Fluorochrome	
	Calcofluor White M2R	Sytox Green
395 – 415	可见蓝白色椭圆状	不可见
470 – 490	不可见	可见黄绿色椭圆状

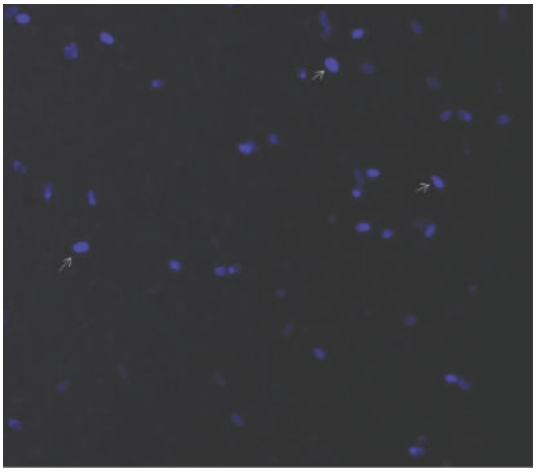

图 1　Calcofluor White M2R 染色后，活的 *Nosema ceranae* 呈现蓝白色荧光（400 ×）

Fig. 1　Live *Nosema ceranae* spores were stained by Calcofluor White M2R in white-blue fluorescence

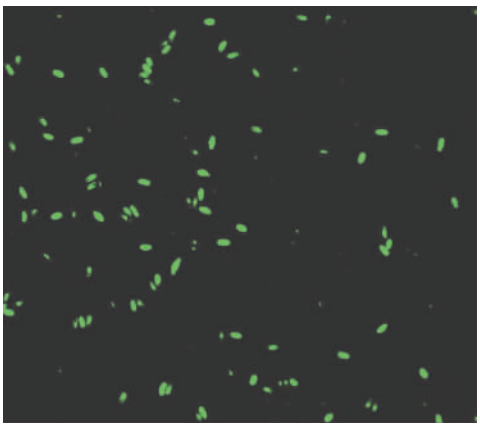

图 2　Sytox Green 染色后，死的 *Nosema ceranae* 呈现黄绿色荧光（400 ×）

Fig. 2　Dead *Nosema ceranae* spores were stained by Sytox Green in yellow-green fluorescence

量，计算出活孢子的比率，进而推断出微孢子虫对寄主的侵染性和危害程度。

3　讨论

本研究通过 Calcofluor White M2R 与 Sytox Green 双重荧光染色，在激发光共聚显微镜下活的 *N. ceranae* 在（405 ± 10）nm 激发波长下呈现蓝白色荧光，而死孢子则基本看不见；死的微孢子虫在（485 ± 10）nm 激发光波长下呈现黄绿色荧光，同样活孢子也看不见，这说明该方法特异性很强。

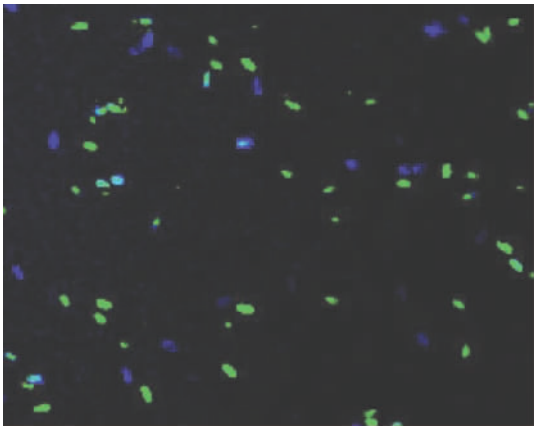

图 3　Calcofluor White M2R 与 Sytox Green 双重染色后，活的 *Nosema* ceranae 呈现蓝白色荧光，死的则显现为黄绿色荧光（400 ×）

Fig. 3　Staining with Calcofluor White M2R and Sytox Green, live *Nosema ceranae* spores were in white-blue fluorescence and dead were in yellow-green fluorescence

通过图像重叠，在同一视野下观察到死、活孢子的情况，在有孢子悬浮液的情况下该检测全过程只需不到 2 h，比分子生物学和免疫学方法快很多。

Calcofluor White M2R 是一种非特异性荧光染料，最早用于检测裂殖类的真菌，目前主要用于鉴别人和其他哺乳动物病原微孢子虫的荧光染色剂（Kimura *et al.*，1966；Weiss and Vossbrinck，1998；Harrington and Hageage，2003；Rasconi *et al.*，2009）。该荧光增色剂主要是通过与真菌几丁质上的 β-1，4 糖苷键特异结合反应的，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（Pavenstädt-Grupp and Ruthmann，1989；Ovcharenko，2003）。这与家蚕微孢子虫经 Calcofluor White M2R 染色后在 600 倍呈现蓝白色荧光的结果一致，但该研究只能判定微孢子虫的存在与否（刘吉平和曾玲，2007），而不能确定家蚕微孢子虫的死活状况。

而核酸染料可作为寄生虫细胞活性鉴定的指示剂，Belosevic 等（1997）用核酸燃料 Sytox 59 免疫荧光染色检测 *Cryptosporidium parvum* 卵囊的活性。SYTOX® Green 核酸燃料是一种带有 3 个正电荷的非对称花青素，能够轻易穿透受损的细胞，但又不会穿过活的细胞。用 SYTOX® Green 染色

孵育一段时间后,细菌和真核生物的光谱分析会有所不同,在 488 nm(450 ~ 490 nm)氩离子激发光光波下,死细胞发出黄绿色荧光(Langsrud and Sundheim, 1996 ; Roth *et al.*, 1997)。通过荧光染色的方法可用于鉴定细胞悬浮液中 *Escherichia coli* O157:H7 的死活及总数(Burnett and Beuchat, 2002),辨别 *Encephalitozoon cuniculi* 微孢子的死活(Green *et al.*, 2000),均与本研究结果一致。

因此,经 Calcofluor White M2R 与 Sytox Green 双重荧光染色可快速有效的区分微孢子虫与其他细菌、病毒等病原物,并在同一视野下对死孢子和活孢子进行计数观察,确定死活孢子的百分比,寄主体内孢子的活性及对寄主的传染性等。这有利于进一步研究抗真菌药物对寄主体内微孢子虫活性的影响作用和微孢子虫的抗药性等研究,为蜜蜂及熊蜂微孢子虫病的致病机理及药物防治奠定了基础。

参考文献(References)

Accoceberry I, Thellier M, Desportes-Livage I, Achbarou A, Biligui S, Danis M, Datry A, 1999. Production of monoclonal antibodies directed against the microsporidium Entero-cytozoon bieneusi. *J. Clin. Microbiol.*, 37(12): 4107—4112.

Belosevic MR, Guy RA, Taghi-Kilani R, Neuman NF, Gyurek LL, Liyanage LRJ, Millard PJ, Finch GR, 1997. Nucleic acid stains as indicators of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Int. J. Parasitol.*, 27(7):787—798.

Burnett SL, Beuchat LR, 2002. Comparison of methods for fluorescent detection of viable, dead, and total *Escherichia coli* O157: H7 cells in suspensions and on apples using confocal scanning laser microscopy following treatment with sanitizers. *Int. J. Food Microbiol.*, 74(1/2):37—45.

Chen YP, Evans JD, Murphy C, Smith IB, Pettis JS, 2009. *Nosema ceranae* is a long-present and wide-spread microsporidian infection of the European honey bee (*Apis mellifera*) in the United States. *J. Invert. Pathol.*, 56(2):142—147.

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): 3811—3814.

Harrington BJ, Hageage GJ, 2003. Calcofluor white: A review of its uses and applications in clinical mycology and parasitology. *Lab. Medicine*, 34:361—367.

Higes M, García-Palencia P, Martín-Hernández R, Meana A, 2007. Experimental infection of *Apis mellifera* honybees with *Nosema ceranae* (Microsporidia). *J. Invert. Pathol.*, 94(3):211—217.

Higes M, Martín R, Meana A, 2006. *Nosema ceranae*, a new microsporidian parasite in honeybees in Europe. *J. Invert. Pathol.*, 92(2):93—95.

Higes M, Martín-Hernández R, Botías C, Bailón EG, González-Porto AV, Barrios L, Nozal MJD, Bernal JL, Jiménez JJ, Palencia PG, Meana A, 2008a. How natural infection by *Nosema ceranae* causes honeybee colony collapse. *J. Environ. Microbiol.*, 10(10):2659—2669.

Higes M, Martín-Hernández R, Garrido E, González-Porto AV, García-Palencia P, Meana A, María J, Nozal D, Mayo R, Bernal JL, 2009. Honeybee colony collapse due to *Nosema ceranae* in professional apiaries. *J. Environ. Microbiol.*, 10(10):110—113.

Higes M, Martín-Hernández R, Garrido-Bailón E, García-palencia P, Meana A, 2008b. Detection of infective *Nosema cerana* (Microsporidia) spores in corbicular pollen of forager honeybees. *J. Invert. Pathol.*, 97(1):76—78.

Kimura M, Kumagai K, Ishida N, 1966. Staining of schizomycetes with calcofluor white M2R. (2). Effect on the growth of the fluorescing bacteria. *Nihon Saikingaku Zasshi*, 21(4):193—195.

Langsrud S, Sundheim G, 1996. Flow cytometry for rapid assessment of viability after exposure to a quaternary ammonium compound. *J. Appl. Bacteriol.*, 81(4):411—418.

Leiro J, Siso MIG, Iglesias R, Ubeira FM, Sanmartín ML, 2002. Mouse antibody response to microsporidian parasite following inoculation with a gene coding for parasite ribosomal RNA. *Vaccine*, 20(21/22):2648—2655.

Naug D, Gibbs A, 2009. Behavioral changes mediated by hunger in honeybees infected with *Nosema ceranae*. *Apidologie*, 10:595—599.

Ovcharenko NA, 2003. New and modified methods for studying microsporidia of aquatic animals. *Hydrobiol. J.*, 39(1):28—38.

Pavenstädt-Grupp I, Ruthmann A, 1989. Microsporidian infection in *Pimpla turionellae* (Ichneumonidae, Hymenoptera): characteristics and reaction with Calcofluor White. *Parasitol. Res.*, 76(1):74—79.

Paxton RJ, Klee J, Korpela S, Fries I, 2007. *Nosema ceranae* has infected *Apis mellifera* in Europe since at least 1998 and may be more virulent than *Nosema apis*.

Apidologie, 38:558—565.

Plischuk S, Marthín-Hernández R, Prieto L, Lucía M, Botías C, Meana A, Abrahamovich AH, Lange C, Higes M, 2009. South American native bumblebees (Hymenoptera: Apidae) infected by *Nosema ceranae* (Microsporidia), an emerging pathogen of honeybees (*Apis mellifera*). *J. Environm. Microbiol.*, 1(2):131—135.

Rasconi S, Jobard M, Jouve L, Sime-Ngando T, 2009. Use of Calcofluor white for detection, identification and quantification of phytoplanktonic fungal parasites. *Appl. Environ. Microbiol.*,75: 2545—2553.

Roth BL, Poot M, Yue ST, Millard PJ, 1997. Bacterial viability and antibiotic susceptibility testing with SYTOX green nucleic acid stain. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(6):2421—2431.

Weiss LM, Vossbrinck CR, 1998. Microsporidisis: molecular and diagnostic aspects. *Adv. Parasitol.*, 40:351—95.

陈文锋，李继莲，Schmid-Hempel P，吴杰，彭文君，安建东，2010. 我国四省区熊蜂中微孢子虫的自然感染率. 福建农林大学学报(自然科学版)，40(3):295—300.

李艳红，张俪，潘国庆，吴正理，庞敏，周泽扬，2006. 家蚕微孢子虫抗体免疫荧光检测方法的建立及应用. 西南农业大学学报: 自然科学版，28(6):990—993.

刘锋，周婷，王强，代平礼，2009. 东方蜜蜂微孢子虫(*N. cernane*)提纯方法优化，中国养蜂学会中蜂协作委员会“2009 年学术交流会”. 中国广西南宁:28—31.

刘锋，2009. 蜜蜂微孢子虫种质资源调查及免疫学诊断技术研究. 硕士学位论文. 北京:中国农业科学院.

刘吉平，曾玲，2007. Calcofluor White M2R 荧光染色法识别家蚕微孢子虫. 昆虫学报,50(11):1185—1186.

万永继，沈佐锐，2005. 微孢子虫归属于真菌的评论. 真菌学报，24(3):468—471.

吴杰，陈文锋，李继莲，2010. 感染蜜蜂及熊蜂的微孢子虫检测与鉴定方法. 中国农学通报，26(19):8—12.