

技术与方法

## 大蜡螟饲料配方的优化<sup>\*</sup>

吴艳艳<sup>1</sup> 周 婷<sup>1\*\*</sup> 王 强<sup>1</sup> 代平礼<sup>1</sup> 龚星鑫<sup>2</sup> 罗其花<sup>1</sup> 刘 锋<sup>1</sup> 宋怀磊<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院蜜蜂研究所 北京 100093; 2. 长江大学农学院 荆州 434023)

**Optimization of artificial diets for *Galleria mellonella*.** WU Yan-Yan<sup>1</sup>, ZHOU Ting<sup>1\*\*</sup>, WANG Qiang<sup>1</sup>, DAI Ping-Li<sup>1</sup>, GONG Xing-Xin<sup>2</sup>, LUO Qi-Hua<sup>1</sup>, LIU Feng<sup>1</sup>, SONG Huai-Lei<sup>1</sup> (1. Institute of Agricultural Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100093, China; 2. College of Agriculture, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

**Abstract** *Galleria mellonella* L. is widely used for insect physiology and biochemistry, insecticide screening, insect toxicology and so on, therefore good and cheap artificial diets are important for mass rearing of *G. mellonella*. As the main components, milk powder and yeast powder were studied. Five groups of artificial diets were used for rearing *G. mellonella*. Based on the comparison of different stages and laying eggs, the optimized diet was obtained, with milk powder 50 g, yeast powder 20 g, wheat flour 100 g, wheat bran 100 g, maize flour 100 g, wax 50 g, honey 50 g and glycerine 60 g. It was confirmed that yeast powder had important positive effect on larvae and pupae development and reproductive performance, and milk powder had the positive effect on larvae development and reproductive performance, but the effect was not as strong as yeast powder. Furthermore they had no effect on the longevity of adult moths.

**Key words** rearing, milk powder, yeast powder, larvae stage, pupal stage, laying eggs

**摘 要** 大蜡螟 *Galleria mellonella* L. 广泛应用于昆虫生理生化、杀虫剂筛选和昆虫毒理学等多个领域, 因此, 选择物美价廉的饲料对其进行大规模饲养具有重要的现实意义。选取占饲料成本份额较高的奶粉和酵母粉作为研究对象, 分 5 组配方进行大蜡螟的饲养实验。通过对每组各个历期和产卵数进行比较, 获得了优化后的饲料配方: 奶粉 50 g、酵母粉 20 g、面粉 100 g、麦麸 100 g、玉米粉 100 g、蜂蜡 50 g、蜂蜜 50 g 及甘油 60 g; 并首次比较了奶粉和酵母粉在大蜡螟发育过程中的作用, 进而明确了酵母粉对大蜡螟幼虫期、蛹期的发育和繁殖能力具有重要的促进作用; 而奶粉对幼虫期发育和繁殖能力具有促进作用, 但作用小于酵母粉; 同时两者与成虫的寿命无关。

**关键词** 饲养, 奶粉, 酵母粉, 幼虫期, 蛹期, 产卵数

大蜡螟 *Galleria mellonella* L. 属于鳞翅目, 螟蛾科 蜡螟属<sup>[1]</sup>, 在昆虫生理生化、杀虫剂筛选、昆虫毒理学和作为繁殖天敌的食物等研究领域应用广泛<sup>[2,3]</sup>; 在生理生化和分子生物学领域中, 研究主要集中在蜕皮激素、保幼激素<sup>[4]</sup>和丝腺等方面; 其幼虫体细胞也可作为生物工程中的基因的表达载体<sup>[5]</sup>; 在线虫学领域中, 它是重要的供试昆虫<sup>[6,7]</sup>; 也可作为细菌<sup>[8]</sup>、真菌<sup>[9]</sup>和病毒<sup>[10]</sup>的活体寄主; 另外, 可作为农药学上的生测昆虫<sup>[11]</sup>。为了满足上述各

领域的研究, 需得到生长一致和发育良好的大蜡螟, 因此利用物美价廉的饲料对其进行大规模饲养显得尤为重要。在大蜡螟饲料配方的研究过程中<sup>[5]</sup>, Warren 等<sup>[12]</sup>和 Marston 等<sup>[13]</sup>的 2 种配方成分较多, 成本昂贵, 因此未能广泛应

<sup>\*</sup> 资助项目: 科研院所社会公益研究专项 (2005DIB4J036); 公益性行业专项 (nyhyzx07-041); 国家蜂产业技术体系建设专项; 中国科技部基础平台项目 (2005DKA21100)。

<sup>\*\*</sup> 通讯作者, E-mail: ztapis@263.net

收稿日期: 2009-03-09, 修回日期: 2009-10-20

用;熊延坤<sup>[5]</sup>、刘长明等<sup>[14]</sup>和张刚应等<sup>[15]</sup>分别对以面粉、酵母粉和奶粉等为主要原料的配方进行了研究,认为其成本较低,来源广泛,饲养效果好,可作为大规模饲养的常规饲料。但随着物价的上涨,占成本份额较高的奶粉和酵母粉的价格也随之高涨,饲养成本居高不下;因此,有必要对饲料配方进一步优化,并明确饲料中奶粉和酵母粉在大蜡螟发育中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 大蜡螟

采自本实验室贮存巢脾上的自然繁殖的大蜡螟,并人工传代。

### 1.2 主要实验器材及饲料

药物稳定性培养箱(上海一恒科技有限公司)、电子温湿度计 HTC-1 型(宁波利胜时代仪器有限公司)、透明塑料盒(11.5 cm × 8.5 cm × 4 cm)、带盖培养皿(Φ58 mm × 13 mm)、体式解剖镜 SMZ-10 型(日本尼康公司)、Multi-position 纤维光照仪(日本尼康公司)、数码图像采集器(日本尼康公司)和图像分析软件(Motic Images Advsterd 3.2)。

蜂蜜与蜂蜡(采自本实验室意大利蜜蜂蜂群)、奶粉(黑龙江红星集团股份有限公司全脂加锌奶粉)、面粉(北京市古船食品有限公司)、玉米粉(北京市玉泉糖业食品厂)、麦麸(中国农科院畜牧兽医研究所)、酵母粉(北京奥博兴生物技术有限责任公司)和甘油(北京北化精细化学品有限责任公司)。

### 1.3 方法

**1.3.1 大蜡螟的繁殖及饲料配制** 大蜡螟的繁殖:在恒温培养箱中饲养,30 ~ 35℃,相对湿度 50% ~ 70%,暗培养,成虫羽化后,交配产卵,将其卵片分离并单独放入盛有少量饲料的空塑料盒内,并置于上述恒温箱中;在幼虫密度较大时需进行分盒饲养并补加饲料。

饲料的配制:为使饲料颗粒均匀细小,本实验室将常规饲料<sup>[5,14,15]</sup>改良为蜂蜡和蜂蜜分别为 50 g、酵母粉为 40 g、奶粉 100 g、面粉 100 g、玉米粉 100 g、麦麸 100 g 和甘油 60 g。配制时

将奶粉、面粉、酵母粉、麦麸和玉米粉混匀;蜂蜡放于蜂蜜中,加热使蜂蜡融化,再迅速倒入事先混匀的干饲料中,快速搅拌,直至颗粒均匀细小,最后加入甘油并搅匀,装入密闭容器内备用。

**1.3.2 5 组待测饲料配方** (A)奶粉 100 g,酵母粉 40 g;(B)奶粉 50 g,酵母粉 20 g;(C)奶粉 50 g,酵母粉 0 g;(D)奶粉 0 g,酵母粉 20 g;(E)奶粉 0 g,酵母粉 0 g;其余不变组份为面粉 100 g、玉米粉 100 g、麦麸 100 g、蜂蜡 50 g、蜂蜜 50 g 和甘油 60 g。

**1.3.3 卵的分离与计数** 将体式解剖镜与数码图像采集器相连,在电脑屏幕上显示图像(图 1),通过此方法对同一天产的均匀卵片进行分离与计数。

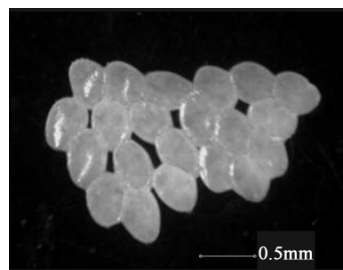


图 1 体式解剖镜下卵的形态

**1.3.4 大蜡螟各个历期的记录** 将塑料盒放于药物稳定性培养箱中,10 g 饲料/盒,(60 ± 5)个卵/盒,33.5℃,相对湿度 50% ± 10%,暗培养,分别对每盒中前 20 只结茧幼虫的发育情况进行观察和记录。

**幼虫期:**从出现初孵幼虫时起(上述条件对应孵化期为 7 d 或 8 d)至幼虫结茧时止;每当幼虫结茧,便将单个茧移置带盖培养皿中。

**蛹期:**从结茧后被单独置于培养皿中起至羽化为成虫时止。

**雌/雄蛾寿命:**上述单独放置的茧从羽化时起至成虫死亡时止。

**产卵数:**按上述 5 组饲料配方进行配置(20 g 饲料/盒),每盒放入 100 粒卵,饲养条件同上。当有羽化的成虫出现时,将当天羽化的一雌一雄放入 250 mL 洁净锥形瓶中,瓶口加盖

封口膜。雌蛾会在封口膜 4 个透气孔夹层处产卵;利用体式解剖镜对卵进行计数,卵总数为产卵期各天的数量之和;每组观察 20 对成虫。

5 组配方分别设置 3 个重复;数据的统计学处理:单因素方差分析(ANOVA)和特奇公正差异显著法(Tukey'S HSD test,  $\alpha = 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 幼虫期的比较结果

通过对大蜡螟幼虫期的统计,得知 A-E 5 种人工饲料对应的幼虫期分别为  $(38.5 \pm 4.6)$  d、 $(36.7 \pm 1.4)$  d、 $(62.3 \pm 16.7)$  d、 $(43.6 \pm 5.1)$  d 和  $(64.4 \pm 8.9)$  d(图 2)。

经分析得知 A 组和 B 组在 5 组中幼虫期最短,且无显著性差异,B 组饲料成本较 A 组减少,可见 B 组是成本低而对应幼虫期最短的配方。

C 组和 E 组不具备显著性差异,可见两组饲料配方对大蜡螟幼虫期的发育影响程度相近,并且均不利于其发育;2 组饲料配方与其它组分相比,分别缺少酵母粉 20 g 和 40 g,尽管 C 组奶粉含量较 E 组多 50 g,但其未能对大蜡螟幼虫期的发育产生明显的改善作用;因此得知酵母粉对大蜡螟幼虫期的发育具有重要的促进作用,并且该作用不能由 50 g 奶粉补偿。

B 组与 D 组幼虫期存在显著性差异,并且前者较后者的奶粉含量多 50 g,由此得知奶粉对大蜡螟幼虫期的发育具有明显的促进作用。

C 组与 D 组幼虫期存在显著性差异,C 组含奶粉 50 g,而 D 组此成份由酵母粉 20 g 代替,D 组幼虫期明显短于 C 组,由此可知酵母粉 20 g 较奶粉 50 g 对大蜡螟幼虫期产生的促进作用强。

### 2.2 蛹期的比较结果

通过对蛹期进行统计,得知 A-E 5 种人工饲料对应的蛹期分别为  $(13.9 \pm 4.2)$  d、 $(13.4 \pm 2.1)$  d、 $(43.6 \pm 31.5)$  d、 $(12.8 \pm 1.8)$  d 和  $(54.2 \pm 32.6)$  d(图 2)。

A 组、B 组和 D 组之间不具备显著性差异,而前两组均含有奶粉和酵母粉,D 组仅有酵母

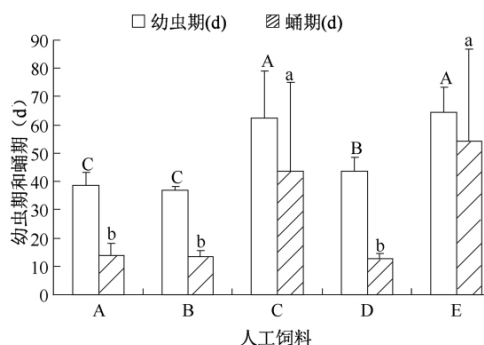


图 2 5 种人工饲料对应的幼虫历期和蛹期

注:不同的大写英文字母表示幼虫期具备显著性差异,小写字母对应蛹期( $P < 0.0001$ )。

粉,由此得知奶粉与大蜡螟蛹期无明显相关性。

C 组和 E 组与其它 3 组具备显著性差异,并缺少酵母粉,由此得知酵母粉对大蜡螟的蛹期具有明显的促进作用。

### 2.3 成虫寿命的比较结果

通过对羽化成虫的寿命进行统计,得知 A-E 5 种人工饲料对应的雌蛾寿命分别为  $(13.0 \pm 2.0)$  d、 $(12.4 \pm 5.6)$  d、 $(16.5 \pm 7.5)$  d、 $(6.3 \pm 4.6)$  d 和  $(6.3 \pm 7.6)$  d(图 3);雄蛾寿命分别为  $(8.2 \pm 3.4)$  d、 $(7.0 \pm 1.0)$  d、 $(9.5 \pm 2.9)$  d、 $(7.1 \pm 3.2)$  d 和  $(6.8 \pm 1.9)$  d;并且雌蛾和雄蛾寿命均不具备显著性差异,即奶粉与酵母粉的含量对大蜡螟成虫寿命无显著性影响。

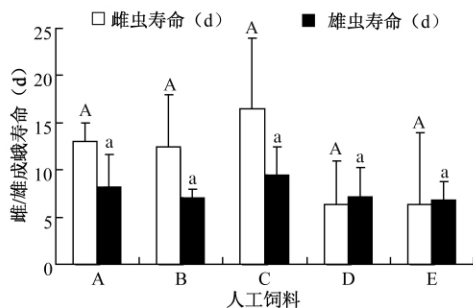


图 3 5 种人工饲料对应的雌/雄蛾寿命

注:不同的大写英文字母表示雌虫寿命具备显著性差异,小写字母对应雄虫寿命( $P < 0.0001$ )。

### 2.4 产卵数的比较结果

通过对交配后雌蛾产卵数进行统计,得知

A-E 5 种人工饲料对应的产卵数分别为 ( $896.5 \pm 178.2$ )、( $1\ 014.8 \pm 327.3$ )、( $340.6 \pm 86.6$ )、( $408.6 \pm 114.9$ ) 和 ( $218.2 \pm 97.7$ ) 粒 (图 4)。

B 组在成本较 A 组减少的情况下,对应的产卵数,即繁殖能力,与 A 组无显著性差异,可知 B 组为成本低而对应产卵数最高的配方。

其它 3 组均与 A、B2 组存在显著性差异,而后 3 组较 A、B 组分别缺少酵母粉、奶粉或上述两者,可见奶粉和酵母粉均对繁殖能力具有明显的促进作用;C 组与 D 组具备显著性差异,前者含有奶粉 50 g,而后者此成份由酵母粉 20 g 代替,后者产卵数明显多于前者,由此得知酵母粉较奶粉对繁殖能力的促进作用大。

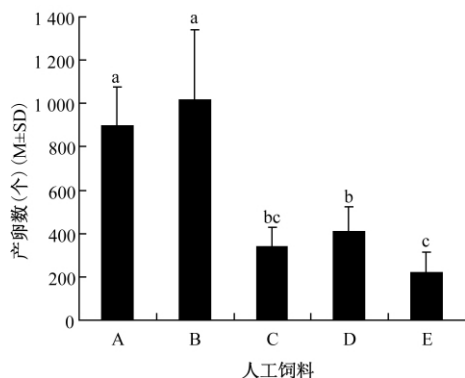


图 4 5 种人工饲料对应的产卵数  
注:不同的小写英文字母表示产卵数具备显著性差异 ( $P < 0.0001$ )

### 3 讨论

通过对 5 种饲料对应的各个历期和繁殖能力进行综合分析得知最优配方为 B 组,即蜂蜡和蜂蜜分别为 50 g、酵母粉 20 g、奶粉 50 g、面粉 100 g、玉米粉 100 g、麦麸 100 g 和甘油 60 g;该组幼虫期为 ( $36.7 \pm 1.4$ ) d,蛹期为 ( $13.4 \pm 2.1$ ) d,产卵数为 ( $1\ 014.8 \pm 327.4$ ) 粒,并且老熟幼虫大小均一,发育良好;而已报道饲料的幼虫期为 ( $42.8 \pm 4.8$ ) d,蛹期为 ( $11.8 \pm 2.5$ ) d,产卵数为 ( $531.0 \pm 320.0$ ) 粒<sup>[14~16]</sup>;由此可知,B 组与常规饲料对应的幼虫期和蛹期相近,并且前者对应的产卵数明显多于后者。B 组配方

较常规配方成本减少而饲养效果不减,这为进行大蜡螟的饲养带来了动力,进而为满足各领域对大蜡螟的需求提供了有益的帮助。本研究也首次揭示了酵母粉对大蜡螟的幼虫期、蛹期的发育和繁殖能力具有重要的促进作用,并且奶粉对幼虫期的发育和繁殖能力也具有促进作用,但较酵母粉作用小;另外,两者对成虫的寿命无显著影响。这为研究饲料中各种成分与各个历期间和繁殖能力的关系提供了一定的理论参考;同时,在需要人为改变大蜡螟的幼虫期或蛹期时,可以依据本文数据通过改变酵母粉或奶粉的含量做出相应的控制,这对工厂生产或实验操作具有一定的指导意义。

另外,除 D 组雌蛾寿命 ( $6.3 \pm 4.6$ ) d 略短于雄蛾寿命 ( $7.1 \pm 3.2$ ) d 外,其余组前者均长于后者,这与胡树森等人的发现相近,即未交尾的雌蛾寿命有延长现象<sup>[17]</sup>;而自然条件下雄蛾寿命长于雌蛾 (雄蛾寿命  $9.2 \text{ d} \pm 3.3 \text{ d}$ ,雌蛾寿命  $5.5 \text{ d} \pm 2.6 \text{ d}$ )<sup>[16,18]</sup>,其原因推测为在自然条件下,雌蛾能与雄蛾交尾并产数千卵,因而消耗体内大量养分和体力而使其寿命缩短;本实验是将单个茧分离后,分别记录其蛹期和成虫的寿命,雌蛾无机会与雄蛾交尾;两者仅依靠其体内养分存活,雌蛾体型和体重均大于雄蛾,因而寿命长于雄蛾,其真正原因还需进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 吴杰,周婷,韩胜明,等.蜜蜂病敌害防治手册.北京:中国农业出版社,2001.173~174.
- 2 万航宇,钱海涛,董辉,等.芫菁夜蛾线虫和嗜菌异小杆线虫寄生特性的比较.昆虫知识,2007,44(4):545~548.
- 3 Andreas V., Vladimir M., Gotz P. Inhibition of phagocytic activity of plasmotocytes isolated from *Galleria mellonella* by entomogenous fungi and their secondary metabolites. *J. Insect Physiol.*, 1997, 43(5):475~483.
- 4 Kolodziejczyk R., Bujacz G., Jakób M., et al. Insect juvenile hormone binding protein shows ancestral fold present in human lipid-binding proteins. *J. Mol. Biol.*, 2008, 377(28):870~881.
- 5 熊延坤.大蜡螟的体色遗传规律及其大规模养殖技术研究.硕士学位论文.北京:中国农业大学,2002.
- 6 Ricardo A., Ramirez II., Donna R., et al. Harmful effects of mustard bio-fumigants on entomopathogenic nematodes.

*Biol. Control* ,2009 ,**48**(2) : 147 ~ 154.

7 Foltan P. ,Puza V. To complete their life cycle , pathogenic nematode-bacteria complexes deter scavengers from feeding on their host cadaver. *Behavi. Proc.* ,2009 ,**80**(1) : 76 ~ 79.

8 Andrejko M. , Dudka M. M. , Jakubowicz T. Antibacterial activity *in vivo* and *in vitro* in the hemolymph of *Galleria mellonella* infected with *Pseudomonas aeruginosa*. *Compar. Biochem. Physiol Part B: Biochem. Mol. Biol.* 2009 ,**152** (2) : 118 ~ 123.

9 Sun B. D. , Liu X. Z. Occurrence and diversity of insect-associated fungi in natural soils in China. *Appl. Soil Ecol.* , 2008 ,**39**(1) : 100 ~ 108.

10 Bruemmer A. ,Scholari F. ,Ferber M. L. ,*et al.* Structure of an insect parvovirus (*Junonia coenia*) determined by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* ,2005 ,**347**(4) : 791 ~ 801.

11 周新胜,刘振生.白僵菌产品生测指示昆虫的研究.森林病虫通讯 ,1997 ,(2) :9 ~ 11.

12 Warren , L. O. ,Huddleston P. Life history of the Greater wax moth ,*Galleria mellonella* , in Arkansas. *J. Kansas Entomol. Soc.* ,1962 ,**35**(1) :212 ~ 216.

13 Marston N. , Brown B. Constitutes in diets for *Galleria mellonella*(L.). *J. Econ. Entomol.* ,1974 ,**67**(4) : 497 ~ 500.

14 刘长明 ,沈乌洋,陈可跃.取食天然饲料和人工饲料的大蜡螟的发育发育差异比较.武夷科学 ,1998 ,(13) :136 ~ 138.

15 张刚应 杨怀文.大蜡螟室内饲养技术.贵州农学院学报 , 1996 ,**15**(1) :46 ~ 49.

16 黄志辉.大蜡螟、小蜡螟的生活习性及其防治对策.昆虫知识 ,1984 ,**21**(1) :36 ~ 39.

17 胡树森,陈日光.大蜡螟生活习性及其防治的初步研究.湖南农学院学报 ,1989 ,(3) :53 ~ 59.

18 黄少康,王建鼎.大蜡螟的生物学研究.中国养蜂 ,2001 , **52**(5) :7 ~ 10.

\*\*\*\*\*

研究选萃

生病蚂蚁会离开巢穴孤独死去

德国雷根斯堡大学 2010 年 1 月 29 日发表公报说 ,生病的蚂蚁会主动离开蚁穴 ,在远离家的地方孤独死去。

雷根斯堡大学动物学院的生物学家在实验中观察到 ,生病的蚂蚁会离开巢穴并孤独地在外死去。进一步研究证实 ,这种主动行为并不是某种特定疾病的病征 ,也不会出现在其他健康蚂蚁的身上。

研究人员说 ,类似的现象也出现在其他群居动物中 ,如大象和狮子。群居动物的这种行为或许是为了防止疾病在种群内传播 ,保障种群延续。

有关论文发表在最新一期美国《当代生物学》( *Current Biology* ) 杂志网络版上。(来源:2010 年 01 月 30 日 新华网)

# 一种酚氧化酶原组织定位的胶体金标记免疫电镜方法<sup>\*</sup>

冯从经<sup>\*\*</sup> 吕文静

(扬州大学园艺与植物保护学院植物保护系 扬州 225009)

**A method for tissue localization of prophenoloxidase based on colloidal gold labeled immunoelectron microscopy.** FENG Cong-Jing<sup>\*\*</sup>, LV Wen-Jing (Department of Plant Protection, College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract** A modified immunogold-labeling technique based on Epon 812 embedding specimen was used to localize prophenoloxidase (PPO) in the midgut and integument tissue from the 5th instar larvae of *Ostrinia furnacalis* Guenée. The mouse anti-*O. furnacalis* PPO serum prepared in our laboratory was used as primary antibody and colloidal gold labeled goat anti-mouse IgG as the secondary antibody. Bis (acetato) dioxouranium and lead citrate were used in the staining system. Both the labeling specific and resolution of electron microscopy were improved.

**Key words** *Ostrinia furnacalis*, prophenoloxidase, colloidal gold, immunoelectron microscopy

**摘 要** 以亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenée 5 龄幼虫的中肠和体壁组织为材料,采用 Epon 812 常规包埋方法,以作者实验室制备的酚氧化酶原多克隆抗体为一抗、胶体金标记的羊抗鼠 IgG 为二抗,采用醋酸双氧铀-柠檬酸铅双染色体系,建立一种胶体金标记的特异性强且超微结构保存较好的亚洲玉米螟幼虫体内中酚氧化酶原免疫电镜定位方法。

**关键词** 亚洲玉米螟, 酚氧化酶原, 胶体金, 免疫电镜

酚氧化酶(phenoloxidase, PO)是节肢动物先天性免疫系统最重要的酶之一<sup>[1]</sup>,通常以其酶原酚氧化酶原(prophenoloxidase, PPO)形式存在,经过丝氨酸蛋白酶有限的蛋白水解作用而激活为 PO<sup>[2]</sup>。PO 参与了昆虫其它许多重要生理过程,如表皮硬化、卵壳鞣化、伤口愈合和对病原微生物和寄生物的包裹作用等<sup>[3]</sup>,最近 Tsao 等还认为 PPO 与白腹丛蚊 *Armigeres subalbatus* 的形态发生有关<sup>[4]</sup>。

目前,已经在虾、蟹等节肢动物的不同组织<sup>[5]</sup>和多种昆虫的血细胞及血清中检测到 PO 活性<sup>[2]</sup>。在冈比亚安蚊 *Anopheles gambiae* 中肠组织<sup>[6]</sup>和外寄生蜂 *Nasonia vitripennis* 的毒液<sup>[7]</sup>中也发现 PO 活性。然而有关 PPO 的产生、转运机制及其表达的动态变化尚存在争论<sup>[8,9]</sup>。

Feng 等<sup>[9]</sup>和 Charalambidis 等<sup>[10]</sup>分别采用

异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)对亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* Guenée 和地中海实蝇 *Ceratitis capitata* 血细胞中的 PPO 和 PO 进行了定位研究,但对其它组织中进行 PPO 定位检测时,免疫荧光标记的组织化学方法分辨率显得不足,难以得到理想结果。免疫电镜技术(immunoelectron microscopy, IEM)是在免疫组织化学技术的基础上发展起来的在超微结构水平上定位、定性及半定量抗原的技术方法。胶体金是目前应用最广的免疫电镜标记物,用于细胞表面和细胞内多种抗原的精确定

<sup>\*</sup> 资助项目:国家自然科学基金(30571248),“973”计划(2006CB102002),扬州大学科技创新培育基金(2008CXJ028)。

<sup>\*\*</sup> E-mail: fengcj@yzu.edu.cn

收稿日期:2009-06-02,修回日期:2009-06-23

位。作者从我国主要粮食害虫亚洲玉米螟幼虫血清中纯化得到 PPO,制备了 PPO 的多克隆抗体,采用改良的胶体金标记法进行亚洲玉米螟幼虫体内 PPO 免疫电镜组织定位研究,为明确 PPO 在昆虫体内的合成转运机制研究提供了重要依据,该方法也可为其他昆虫体内酶的组织或细胞定位研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

亚洲玉米螟幼虫在  $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,相对湿度  $>80\%$  和光周期 L:D = 14 h:10 h 的温室条件下按周大荣等<sup>[11]</sup>方法,采用半人工饲料进行饲养;PPO 抗血清制备按冯从经等<sup>[12]</sup>方法,通过免疫 Balb/c 小鼠制得;10 nm 金标羊抗鼠 IgG 购自上海史瑞可生物技术公司。其它所用试剂为国产分析纯试剂。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 取样与固定** 参照夏快飞等<sup>[13]</sup>的方法略有修改。取解剖好的亚洲玉米螟 5 龄幼虫中肠和体壁组织放入 0.01 mol/L 的磷酸缓冲液 (PBS, pH 7.2) 充分洗涤,再用双蒸水充分洗涤。将组织投入固定液 (0.01 mol/L PBS, 4% 多聚甲醛, 0.05% 戊二醛, pH 7.2, 现配现用) 中  $4^\circ\text{C}$  下固定过夜。

**1.2.2 脱水与包埋** 0.01 mol/L PBST (0.01 mol/L PBS, pH 7.2; 0.1 mol/L NaCl; 0.02% Tween-20) 洗涤样品标本 3 次,每次 15 min,充分洗涤后  $4^\circ\text{C}$  下系列乙醇脱水 (30% 乙醇 45 min; 50% 乙醇 15 min; 70% 乙醇 15 min; 80% 乙醇 15 min; 90% 乙醇 15 min; 95% 乙醇 15 min; 100% 乙醇 15 min),然后将组织浸入 100% 丙酮 30 min。再将组织浸于丙酮:Epon 812 (1:1) 混合液中 1 h,丙酮:Epon 812 (1:2) 混合液中 2 h,纯包埋剂 Epon 812 中 2 h。将组织放入包埋板,置恒温箱  $37^\circ\text{C}$  24 h,  $60^\circ\text{C}$  72 h。

**1.2.3 切片与饰刻** 从包埋板上取下组织,修成  $2\text{ mm}^3$  组织块,在超薄切片机上 (徕卡,德国) 进行超薄切片后,覆在 200 目镍网上。参地应用于细胞内各种生物大分子的定性、定位

照吴洪娟等<sup>[14]</sup>的方法,将覆有切片的镍网浸于蒸馏水中 5 min。吸干水分后将切片朝下于 10% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  中蚀刻 5 min,再吸干  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,在 PBST 中洗涤 3 次。

**1.2.4 胶体金标记** 用封阻液 (PBST, 0.2 mmol/L 甘氨酸, 1% 牛血清白蛋白, pH 7.2) 室温封阻切片 30 min。PBST 洗涤 3 次,加含 1% 牛血清白蛋白的 PBST (pH 7.2) 稀释抗血清 (1:50),于  $37^\circ\text{C}$  温育 2 h。PBST 洗涤 3 次,用封阻液室温封阻 30 min。PBST 洗涤后,加入含 1% 牛血清白蛋白的 PBST (pH 7.2) 稀释后的 10 nm 金标羊抗鼠 IgG (1:20) 适量,于  $37^\circ\text{C}$  温育 1 h。双蒸水充分洗涤,自然干燥。

**1.2.5 染色与电镜拍照** 切片经 2% 的醋酸双氧铀室温避光染色 60 min,再用 10% 柠檬酸铅室温避光染色 10 min。双蒸水充分洗涤,充分干燥后采用 Tecnai 12 透射电子显微镜观察并拍照。对照组包埋前处理步骤及包埋步骤与处理组相同,修块并做超薄切片后,覆在铜网上直接经 2% 的醋酸双氧铀室温避光染色 40 min, 10% 柠檬酸铅室温避光染色 20 min,再用双蒸水充分洗涤、干燥,采用 Tecnai 12 透射电子显微镜观察并拍照。

## 2 结果与分析

检测结果显示,在亚洲玉米螟 5 龄幼虫的中肠细胞内存在胶体金标记颗粒,胞质内可见致密的质地均匀、大小一致、圆形黑色金颗粒,多散布在胞质中,有些呈团状或点状分布 (图 1A)。在阴性对照的中肠组织切片中,则没有发现胶体金颗粒沉积 (图 1B)。同样,在幼虫体壁组织中均可见电子密度高而清晰的圆形金颗粒,聚集的胶体金颗粒清晰可见,背景清洁,无非特异性散在颗粒,呈小团状或点状分布在体壁细胞内 (图 1C),而在阴性对照的体壁组织切片中没有发现胶体金颗粒 (图 1D)。

## 3 讨论

胶体金免疫电镜技术自产生以来已被广泛及抗原特异性等方面的研究。通过不断改进,