



技术主题

Technology Feature

用光学显微镜观察 Bt 菌的芽孢和晶体

周燕^{1,2}, 黄飞燕^{1,2}, 赵从², 朱锦天²

1 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西大学生命科学技术学院, 南宁, 广西, 中国

2 海南省热带农业资源研究所, 三亚, 海南, 中国

✉ 通讯作者: Crystal.Z.Chow@gmail.com ✉ 作者

基因组学与生物技术, 2012 年, 第 1 卷, 第 9 篇 doi: 10.5376/gb.cn.2012.01.0009

本文首次以英文发表在 Bioscience Methods, 2011, Vol.2, No.2 上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 用中文再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。如果读者对中文含义理解有歧义, 请以英文原文为准。

引用格式:

Zhou et al., 2014, Observing Spores and Crystals of *Bacillus thuringiensis* under Optical Microscope, Bioscience Methods, 2011, Vol. 2, No. 2, pp.6-8

(doi: 10.5376/bm.2011.02.0002)

摘要

本文报告了本实验室用光学显微镜观察 Bt 菌的芽孢和晶体的实验方法。利用光学显微镜能有效观察菌株的芽孢和晶体蛋白, 是快速鉴定和区别于芽孢杆菌属的 *Bacillus cereus* 亚组的其它成员, 如 *Bacillus cereus* 和 *B. anthracis* 的最有效的手段之一。

关键词: *Bacillus thuringiensis*; *Bacillus cereus* 亚组; 光学显微镜; 芽孢; 晶体蛋白

Observing Spores and Crystals of *Bacillus thuringiensis* under Optical Microscope

Yan Zhou^{1,2}, Feiyan Huang^{1,2}, Cong Zhao², Jintian Zhu²

1. State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, College of Life Science and Technology of Guangxi University, Nanning, Guangxi, China

2. Hainan Tropical Agricultural Resources Institute, Sanya, Hainan, China

✉ Corresponding author, Crystal.Z.Chow@gmail.com; ✉ Authors

Abstract

In this paper, we reported the experimental protocol of observation Bt spores and crystals under optical microscope. Based on the tool of optical microscope, we can effectively observe spores and crystals, which are the key elements to rapidly identify and distinguish *Bt* from other members of subgroup of *Bacillus cereus* in *Bacillus* genus, such as *Bacillus cereus* and *B. anthracis*.

Keywords: *Bacillus thuringiensis*; Subgroup of *Bacillus cereus*; Optical microscope; Spore; Crystal protein

引言

Bacillus thuringiensis, 简称 Bt, 是革兰氏阳性、芽孢形成菌, 归属到芽孢杆菌属的 *Bacillus cereus* sensu latu 亚组。*Bacillus cereus* sensu latu 亚组包含 *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, 和 *B. weihenstephanensis* 六个成员组成, 与 *Bacillus*

cereus 亚组其他成员相比, Bt 菌有个显著的特征, 能在芽孢形成期产生蛋白质的杀昆虫晶体。

利用光学显微镜观察菌株的芽孢和晶体蛋白是鉴定和区别于芽孢杆菌属的 *Bacillus cereus* 亚组的其它成员, 如 *Bacillus cereus* 和 *B. anthracis*, 的最有效的手段之一。本文报告了本实验室用光学显微镜观察 Bt 菌的芽孢和晶体的实验方法, 该方法证明是十分简捷并且有效。

1 仪器设备及操作

本技术采用的显微镜为 OLYMPUS DP70, 由

收稿日期: 2012 年 10 月 25 日

接受日期: 2012 年 12 月 03 日

发表日期: 2012 年 12 月 15 日

日本生产(图 1), 图像的分辨率可高达 4080×3072 像素。利用油镜镜头, 最大放大倍数可达 1000 倍。



图 1 本研究使用的 OLYMPUS DP70 显微镜

Figure 1 The Olympus Digital Microscope DP70 Model used in this study

显微镜(油镜)观察的操作步骤:

- (1) 样品对焦: 先用低倍物镜对样品对焦。
- (2) 香柏油覆盖样品: 油镜下在盖玻片上滴一滴香柏油。
- (3) 聚焦观察: 调节细准焦螺旋。
- (4) 观察记录: 眼睛观察, 找到合适视野, 记录、照相;观察完毕, 下降载物台, 将油镜头转出, 取下载玻片。
- (5) 镜头清洁: 先用擦镜纸擦去镜头上的油, 再用少许无水乙醇擦去镜头上残留油迹, 最后最后擦干清洗剂。

2 化学试剂及配制

吸取 10 mL A 溶液(A: 碱性复红[又称碱性品红, fuchsin] 1 g; 无水乙醇 10 mL (10%w/v))与 90 mL B 液(B: 石炭酸(苯酚)5 g, 溶于 mili-Q 超纯水 100 mL (5%w/v)), 充分混合成石炭酸复红液, 4℃保存。使用前稀释 10 倍, 再用 Pall Supor® Membrane 0.45 μm 滤器过滤除菌, 待用。

3 实验流程

3.1 制备观察菌液

将新鲜活化的 *Bt* 菌株在 NB 培养平板上 30℃ 倒置培养 72 h 以上, 至芽孢完全形成。

3.2 制片

- (1) 取一滴 ddH₂O 点在载玻片中央, 挑取少量菌苔在水滴中反复涂布均匀。
- (2) 当水滴充分风干, 可微火加热使水分加快蒸发。
- (3) 将已干燥的涂片在微火上迅速通过 2-3 次, 使菌体与玻片结合牢固。
- (4) 待切片冷却即可进入染色步骤。

3.3 染色

- (1) 滴加石炭酸复红染液于涂片上, 室温染色 30~60S。
- (2) 然后倾去染液, 用水清洗至无色。
- (3) 盖上盖玻片, 准备观察。

3.4 观察

- (1) 将切片置于显微镜 100X 油镜下进行观察: 调节粗调旋钮, 让油镜浸没在松柏油中, 尽量靠近观察玻片, 但不要让镜头接触到玻片。然后轻微调节旋钮使物镜缓慢上升至图像出现, 然后调节微调旋钮至图像清晰可见。
- (2) 镜检时, 晶体蛋白呈红色, 芽孢呈无色。

3.5 拍照

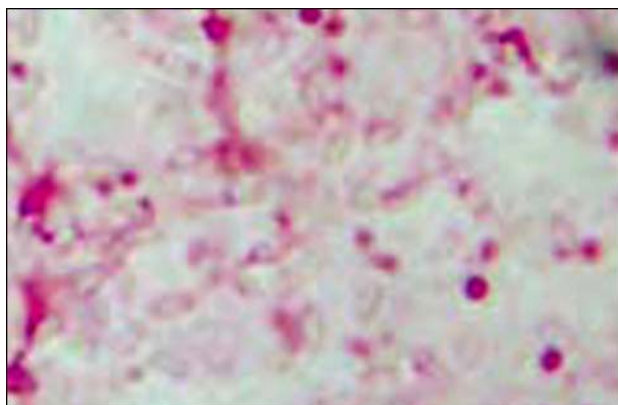
设置显微镜照相系统的各种拍照参数, 调节好背景颜色。注意每张照片上要有标尺, 一般取 10μm。

4 例证分析

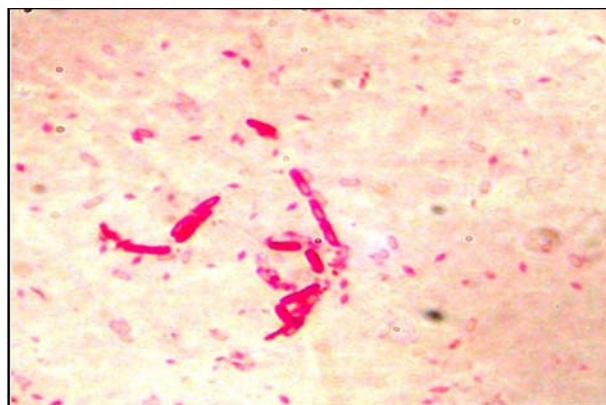
Bt 的最主要特征就是在生长后期产生芽孢和伴孢晶体, 因此可以在这个时期用显微镜来观察。本案例中, 我们以 *Bt* 分离株 S2160-1 (Zhang et al., 2012)、模式菌株 HD-73 为实验材料, 采用石炭酸复红染液色的方法对生长后期的 *Bt* 菌进行染色镜鉴。如图 2 观察结果显示, 在以红色或浅红色为背景下, 2 个菌株都能观察到无色的芽孢; HD-73 都为红色的菱形晶体, S2160 为红色圆形晶体。

5 讨论

要获得高质量的显微镜观察照片, 实验过程



S2160-1



HD-73

图 2 光学显微镜观察 Bt 菌株(100×油镜)

Figure 2 Bt strains observed by optical microscopy with 100× oil immersion lens

中需要注意以下几点:

首先, 待观察的菌体要培养到芽孢完全形成, 即 48-72 h 以上不同的菌株可能不同, 保证存在预期需要观看的内容的材料。

其次, 切片上的菌苔涂布要均匀, 切勿挑取过多的菌体进行涂布, 否则会导致菌体不够分散, 重叠在一起, 不能清楚观察到晶体和芽孢的形状; 切勿挑取到培养基, 否则会影响观察的背景。

第三, 待观察的切片要保留适当的水分, 太干燥了, 也不利于观察, 因此, 最好的观察时间是制作完成后立即观察。

最后, 显微镜的选择与调节也很重要, 如果显微镜成像系统不好, 即使观察结果很好, 但不能获得高质量的照片, 也不能将结果呈现给我们。

发表论文

Zhang W., Crickmore N., George Z., Xie L., He Y.Q., Li Y., Tang J.L., Tian L., Wang X., and Fang X., 2012,

Characterization of a new highly mosquitocidal isolate of *Bacillusthuringiensis*--an alternative to *Bti*? J. Invertebr. Pathol., 109(2): 217-222

Fang and Zhang, 2011, Bt S2160-1, a High Mosquitocidal Strain of *Bacillus thuringiensis*, Bt Research, Vol.3, No.5 29-32 (doi: 10.5376/bt.2012.03.0005)

致谢

这是 HITAR 实验室常用的用于 Bt 鉴定的试验方法, 感谢 HITAR 允许将该方法公布。本工作是在广西大学亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室进行案例验证。在此表示感谢。

参考文献

Zhang,W., Crickmore,N., George,Z., Xie,L., He,Y.Q., Li,Y., Tang,J.L., Tian,L., Wang,X. and Fang,X., 2012, Characterization of a new highly mosquitocidal isolate of *Bacillusthuringiensis*--an alternative to *Bti*? J. Invertebr. Pathol. 109(2): 217-2