海洋微生物数量、大小及形态的流式检测

Enumeration and Characterization of Marine Microorganisms by Flow Cytometry

卢余盛^{1, #}, 钟春莲^{1, #}, 贾力^{1, 2, *}, 陈建明^{1, *}

¹海洋药物研发中心, 海洋研究院, 闽江学院, 福州, 福建; ²福建省肿瘤转移药物干预重点实验室, 化学学院, 福州大学, 福州, 福建

*通讯作者邮箱: jiali@fzu.edu.cn; chenjm@mju.edu.cn

#共同第一作者/同等贡献

引用格式: 卢余盛, 钟春莲, 贾力, 陈建明. (2019). 海洋微生物数量、大小及形态的流式检测.

Bio-101 e1010345. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010345.

How to cite: Lu, Y. S., Zhong, C. L., Jia, L. and Chen, J. M. (2019). Enumeration and Characterization of Marine Microorganisms by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010345. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010345. (in Chinese)

摘要: 海洋微生物在维持海洋生态系统动态平衡过程中起到重要作用, 海洋中微生物数量和群体的变化直接反映了海洋生态环境状况。因此, 海洋微生物数量和群体分析在海洋环境监测和海洋生态系统研究中具有重要意义。根据海洋微生物的光散射特性和荧光性质, 通过流式细胞仪 (Flow cytometry, FCM) 对其进行数量、大小和形态分析, 具有所需样本量少、操作简单、快速和准确性高的特点。

关键词: 海洋微生物, 流式细胞术, 微生物数量

材料与试剂

1. 流式管 (美国 BD 公司, BD 352054)
2. 流式计数标准微球 (美国 Invitrogen™ 公司, catalog number: PCB100)
3. 颗粒大小荧光标准微球 (美国 Invitrogen™ 公司, catalog number: F13838)
4. FACS Clean (美国BD公司, catalog number: 334030)
5. CS&T微球 (美国BD公司, catalog number: 641319)
6. 无菌 PBS (pH = 7.2~7.4, Solarbio, catalog number: P1020)
7. 无水乙醇 (国药集团, catalog number: 10009259)

8. 50%的戊二醛溶液 (Sangon Biotech, catalog number: A500484)

仪器设备

1. 流式细胞仪 (美国 BD 公司, model: FACS AriaIII)
2. 小型低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司, model: 5424R)
3. 超声波清洗仪 (中国波达公司, model: 1200)
4. -80 °C 冰箱 (中国海尔集团, model: DW-86L388)

实验步骤

1. 样品采集: 在福建附近海域, 依据采水标准层次采取 50~200 ml 水样。采水器上的采样瓶、采样袋及实验室内样品处理过程均需无菌操作。
2. 样品预处理: 水样经 70 μm 滤膜进行预过滤, 去除杂质, 以免堵塞流式细胞仪 (徐美珠, 2001; 晁等, 2003; Cuvelier 等, 2010; 邱元凯, 2013; 缪栋, 2017)。如果样本不能在采集 12 小时内完成检测, 可用移液器转移 1.98 ml 水样于冻存管内, 然后加入 20 μl 浓度为 50% 的戊二醛, 使其终浓度达到 0.5%, 轻轻混匀, 避光固定 15~20 min, 4 °C 保存, 一个月内完成流式检测。若需长期保存, 放于液氮中快速冷冻, 最后放置于 -80 °C 冰箱中保存直至分析。
3. 样品准备: 将保存在 -80 °C 冰箱的样品放入 4 °C 冰箱避光解冻。取 1 ml 实验样本至流式上样管中, 并加入 1 μl 流式计数标准微球 (微球直径大小为 6.4 μm 左右, 使其终浓度为原始浓度的千分之一, 用于海洋微生物的绝对计数); 取 1 ml 无菌水至新的流式上样管中, 分别加入 1 μl 直径为 1.0 μm 、2.0 μm 和 10.0 μm 的 FITC 标记的荧光微球, 作为测定细胞大小的参照组; 取 1 ml 无菌水至新的流式上样管中, 分别加入 1 μl 直径为 6.0 μm 未经荧光标记的微球, 作为阴性对照组, 用于调节流式参数; 轻轻颠倒混匀, 避光保存待上机检测。
4. 样品染色 (可选, 用于细菌检测): 加入终浓度为 $1\times$ 的 SYBR Green I 荧光染料, 混匀后在 80 °C 水浴锅中避光染色 10 min, 取出样品在室温下避光冷却 5 min (Pinhassi 等, 1997; Fuhrman, 1999; Marie 等, 1999)。
5. 上样检测 (Marie 等, 1999, 2004, 2010, 2014 和 2017; Fuchs 等, 2000; 徐美珠, 2001; Becker 等, 2002; 缪栋, 2017)。

5.1 流式细胞仪校准和实验模板建立：在进行样本检测之前，先按照标准程序对流式细胞仪进行开机、无菌清洗，并通过**CS&T**微球对流式细胞仪进行追踪校准和稳定性检测。仪器稳定性检测通过后，打开**488 nm**激光器，建立实验模板，选择实验所需的绿色荧光通道、橙红色荧光通道和红色荧光通道，并将采集检测过程中的前向散射光、侧向散射光和荧光信号均选用对数信号模式，画出实验分析所需的参数图，如双参数散点图等。

注：由于海洋微生物直径很小，因此前向和侧向散射光均需选择对数信号放大模式。

5.2 参数调整：将阴性对照样本管放入上样台进行上样检测，调整**Cytometer** 面板中**FSC/SSC** 通道电压，使微球信号位于利于观察的位置，然后再调节各荧光通道电压，使各通道荧光强度处于阴性区域（各通道荧光强度调节至 10^2 以内）。调整阈值（**Threshold**），去除碎片和噪音信号。调整上样速度（**Flow Rate**），使进样速度控制在**100~300**颗粒/秒。

5.3 圈门：将样本管放入上样台进行检测，在**FSC/SSC** 中调整门的位置、大小和形状，使之圈住感兴趣细胞群。调节荧光通道的电压，使荧光信号位于合适的位置。

5.4 数据采集：实验条件调整完毕后，开始采集数据，每个样本收集**10,000**个流式计数标准微球作为数据收集终止时间。

5.5 利用BD FACS Diva软件对仪器进行操作和数据分析。

- 6. 浮游植物检测策略：**浮游植物在海洋微生物中占有相当大的比例，根据细胞直径大小可以将其划分为小型浮游植物（直径大于**20 μm**）、微型浮游植物（直径**2~20 μm**）和超微型浮游植物（直径小于**2 μm**）三类，因此可以根据**FSC**和**SSC**对其进行初步分类。由于聚球藻细胞中含有藻红蛋白，因此可以根据其发出的橙红色荧光信号而较好的与其他类群区别开来。皮微级浮游植物和纳微级浮游植物具有最高的红光及**SSC**信号，而且皮微级浮游植物细胞小于纳微级浮游植物，结合**FSC**细胞可以对这两类群进行区分。
- 7. 异养细菌和光能自养型细菌检测策略：**海洋浮游异养细菌是海洋食物链的重要组成部分，在海洋生态系统中具有十分重要的作用，它们能把海洋中溶解有机物质转变成自身的颗粒有机物质，对海洋初级生产力的贡献达到**20%**。利用红光-绿光信号可以将总细菌中具有色素的光能自养型细菌挑选出来。然后通过反向画门，将光能自养型细菌去掉，然

后根据SSC-SYBR Green I (FL1荧光通道) 二维图将高核酸和低核酸类异养细菌群区分开来。

结果与分析

通过流式细胞仪对海洋微生物的大小、形态及荧光特性进行检测和分析,可以获得具有特殊生物学特性的海洋微生物。**Alle** 等根据海洋浮游植物的大小和荧光特性,通过流式细胞仪分析、分选,从大西洋中分离得到微藻群 (图 1),随后通过宏基因组学分析该微藻群在生物进化和海洋生态系统中的作用 (Cuvelier 等, 2010)。

图 1. **Alle** 等通过流式细胞仪从大西洋中分选得到特定微藻。根据浮游植物群的前向散射光 (FSC)和叶绿素衍生的红色荧光特征对浮游微生物进行区分,得到特定大小和荧光特性的微藻。图中最下方的最大的一群为原绿球藻群,在其上方的为聚球藻群,最上面荧光最强且最大的为真核微生物,右下方的黑色方框代表 0.75 μm 的微球 (Cuvelier 等, 2010)。

Marie 等利用不同类型微藻细胞的大小 (FSC)、细胞内部颗粒复杂程度 (SSC)和所含有的色素成分差异进行流式分群分析 (Marie 等, 2004)。如图 2 所示,通过 FSC、SSC、红色荧光、黄色荧光两两通道组合进行作图,可以将不同大小、不同荧光强度的微藻细胞区分,共区分得到 10 中不同类型的微藻细胞群 (Marie 等, 2004)。

图 2. Marie 等利用不同类型的微藻所含有的色素成分和细胞大小差异进行流式分群分析 (Marie 等, 2004)

失败经验

1. 测定微型浮游植物最好采用未固定的新鲜样品，在4 °C条件下样品可保存12小时，如果样品不能在此时间内分析，需将样品固定保存在-80 °C条件下以备以后分析。
2. 固定通常会导致细胞丢失，因此固定剂的选择十分重要。因为微型浮游植物通常在光散射和色素荧光的基础上区分，固定程序必须保持这些特征。传统的甲醛并不适用于海洋微生物的固定，因为它们改变细胞形状或显著影响荧光。同样，使用乙醇固定会抽提出亲脂的色素从而导致荧光丢失。自然海水样品可保存在0.5%~1%终浓度的聚甲醛或0.1%~1%终浓度的戊二醛溶液或二者混合液中。
3. 在对微型浮游植物记数时，应注意两个问题：1)荧光微球作内参标准会有一些问题，因为绝大多数微球沾污有毒物质，对活细胞有副影响，而且微球很容易沾污到试管壁上；2)记数时，上样速率不宜超过200~400颗粒/秒。当记数速率超过400颗粒/秒时，计数的准确性会明显降低；另一方面，每次数据收集获得的细胞数不应少于10,000个，否则变异系数会随着得到的细胞数减少而增加。

致谢

本工作的顺利开展得益于国家自然科学基金项目 (资助号: 81703555, 81773063, U1505225 和 81273548)、国家重点基础研究发展计划 (973 计划)项目 (资助号: 2015CB931804)、中国大洋专项课题 (资助号: DY135-2-13)、福建省科技厅平台项目 (资助号: 2018N2001)、教育厅平台项目和中国博士后科学基金 (资助号: 2017M620268) 的经费支持。

参考文献

1. 晁敏, 张利华, 张经. (2003). [海洋微小型浮游植物的流式细胞计数据分析](#). 华东师范大学学报 (自然科学版), 3: 105-108.
2. 缪栋. (2017). [海参养殖池微生物多样性及其动态研究](#). 扬州大学硕士学位论文.
3. 邱元凯. (2013). [流式细胞仪的原理及其在微型浮游植物生态学中的应用](#). 科技信息, 9: 285-286.
4. 徐美珠. (2001). [海洋微生物在抑藻/检毒/消污中的应用研究](#). 厦门大学硕士学位论文.
5. Becker, A., Meister, A. and Wilhelm, C. (2002). [Flow cytometric discrimination of various phycobilin-containing phytoplankton groups in a hypertrophic reservoir](#). *Cytometry* 48(1): 45-57.
6. Cuvelier, M. L., Allen, A. E., Monier, A., McCrow, J. P., Messie, M., Tringe, S. G., Woyke, T., Welsh, R. M., Ishoey, T., Lee, J. H., Binder, B. J., DuPont, C. L., Latasa, M., Guigand, C., Buck, K. R., Hilton, J., Thiagarajan, M., Caler, E., Read, B., Lasken, R. S., Chavez, F. P. and Worden, A. Z. (2010). [Targeted metagenomics and ecology of globally important uncultured eukaryotic phytoplankton](#). *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(33): 14679-14684.
7. Fuchs, B. M., Zubkov, M. V., Sahm, K., Burkill, P. H. and Amann, R. (2000). [Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques](#). *Environ Microbiol* 2(2): 191-201.
8. Fuhrman, J. A. (1999). [Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects](#). *Nature* 399(6736): 541-548.

9. Marie, D., Brussaard, C. P. D., Thyraug, R., Bratbak, G. and Vaulot, D. (1999). [Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry.](#) *Appl Environ Microbiol* 65(1): 45-52.
10. Marie, D., Le Gall, F., Edem, R., Gourvil, P. and Vaulot, D. (2017). [Improvement of phytoplankton culture isolation using single cell sorting by flow cytometry.](#) *J Phycol* 53(2): 271-282.
11. Marie, D., Rigaut-Jalabert, F. and Vaulot, D. (2014). [An improved protocol for flow cytometry analysis of phytoplankton cultures and natural samples.](#) *Cytometry A* 85(11): 962-968.
12. Marie, D., Shi, X. L., Rigaut-Jalabert, F. and Vaulot, D. (2010). [Use of flow cytometric sorting to better assess the diversity of small photosynthetic eukaryotes in the English Channel.](#) *FEMS Microbiol Ecol* 72(2): 165-178.
13. Marie, D., Simon, N. and Vaulot, D. (2004). [Phytoplankton cell counting by flow cytometry.](#) *Algal culturing techniques*. 17: 253-267.
14. Pinhassi, J., Zweifel, U. L. and Hagstrom, A. (1997). [Dominant marine bacterioplankton species found among colony-forming bacteria.](#) *Appl Environ Microbiol* 63(9): 3359-3366.