海洋病毒的流式检测

Flow Cytometric Analysis of Marine Virus

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). 海洋病毒的流式检测. *Bio-101* e1010346. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010346.

How to cite: Lu, Y. S., Zhong, C. L., Jia, L. and Chen, J. M. (2019). Flow Cytometric Analysis of Marine Virus. *Bio-101* e1010346. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010346. (in Chinese)

摘要: 海洋病毒是海洋环境中数量最多的生物群类, 每毫升海水中病毒浓度通常为 $10^6 \sim 10^8$ 个, 在海洋生态系统中具有重要作用, 可以促进生物进化、推动生物地球化学循环、构建浮游生物群落、调节水平基因转移等。因此, 通过流式细胞仪分析海洋病毒的丰度和类型对于海洋生态系统多样性的研究具有重要意义。本文通过 SYBR Green I 法对海水中浮游病毒丰度和病毒类型进行分析。

关键词: 海洋病毒, 海洋生态系统, SYBR Green I 染色, 流式细胞术

材料与试剂

1. 流式管 (美国 BD 公司, catalog number: 352054)
2. 颗粒大小荧光标准微球 (美国 Invitrogen™ 公司, catalog number: F13839)
3. CS&T微球 (美国BD公司, catalog number: 641319)
4. 10,000× SYBR Green I 荧光染料 (Solarbio, catalog number: SY1020)
5. FACS Clean (美国BD公司, catalog number: 334030)
6. 无水乙醇 (国药集团, catalog number: 10009259)
7. 无菌 PBS (pH=7.2~7.4) (Solarbio, catalog number: P1020)
8. Tris-EDTA溶液 (pH = 8.0, Sigma-Aldrich, catalog number: 93283)
9. 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. -80 °C 冰箱 (中国海尔集团, model: DW-86L388)
4. 超声波清洗仪 (中国波达公司, model: 1200)

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 3.0 μm 滤膜进行预过滤, 去除大颗粒杂质 (Fuhrman, 1999; Marie 等, 1999; Brussaard, 2004; Duhamel and Jacquet, 2006; Munn, 2006; Nicole 等, 2006; 蔡兰兰, 2006)。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 (蔡兰兰, 2006)。

注: 如果只对水样中的病毒进行分析, 可使用 0.2 μm 滤膜进一步过滤去除海水中的浮游细菌、海藻等较大尺寸的微生物。

3. 样品准备: 将保存在 -80 °C 冰箱的样品放入 37 °C 恒温水浴锅中解冻。在染色前一般需要使用 Tris-EDTA 对样品进行稀释以达到流式细胞仪最佳的分析浓度范围 ($10^5 \sim 10^6$ cells/ml) (Brussaard, 2004)。
4. 样品染色: 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 (Fuhrman, 1999; Marie 等, 1999; Brussaard, 2004; Duhamel 和 Jacquet, 2006)。
5. 加入内参: 往染色好的样品中加入终浓度为 1% 左右的 1.0 μm 标准荧光微球作为内参。
6. 上样检测:

6.1 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，建立实验模板，选择实验所需的SYBR Green I荧光通道 (若仪器模板中没有SYBR Green I染料可选，可选择FITC染料对应的荧光通道)，并将采集检测过程中的前向散射光、侧向散射光和SYBR Green I荧光信号均选用对数信号模式 (由于病毒直径很小，因此前向和侧向散射光均需选择对数信号放大模式)，画出实验分析所需的参数图，如双参数散点图等。

6.2 参数调整：将未经SYBR Green I染色的样本管放入上样台进行上样检测，调整Cytometer 面板中各通道电压，使FSC/SSC 中信号位于利于观察的位置，调整SYBR Green I电压，使其处于阴性区间。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。

6.3 圈门：将经SYBR Green I染色的样本管放入上样台进行上样检测，选取SYBR Green I阳性的颗粒进行圈门，然后根据SYBR Green I/SSC 的荧光强度进行分析。

6.4 数据采集：实验参数调整完毕后，开始采集数据，每个样本收集10,000个待研究的颗粒，以达到统计学水平。

6.5 利用BD FACSDiva软件对仪器进行操作和数据分析。

7. 病毒检测策略：由于病毒颗粒的尺寸很小 (一般病毒颗粒小于200 nm)，直接根据FSC/SSC散点很难将病毒和背景噪音信号区分开来。因此，在流式检测病毒的实验中，我们需要通过SYBR Green I荧光通道进行反向画门，先以1 μ m微球作为参照调整FSC/SSC电压使得微球处于散点图右上角，然后根据选取SYBR Green I阳性的颗粒进行圈门，圈取的颗粒群即可有效的排除背景噪音信号。然后再根据SYBR Green I荧光强度和SSC区分不同类型的病毒。

结果与分析

Brussaard 等通过流式细胞仪对 14 种不同类型的海洋病毒进行检测 (Brussaard, 2004)。如图 1 所示，由于不同的病毒具有不同的核酸含量和不同的颗粒复杂度，因此通过流式细胞术可以将表现出不同的 SYBR Green I 荧光信号 (代表 SYBR Green I 染料与 DNA 结合量)和 SSC 信号 (代表病毒颗粒内部结构的复杂程度) 强度的海洋病毒进行区分。

图 1. 12 种不同病毒培养物和两个天然病毒样品 (NS 1 和 NS2) 的 SYBR Green I/SSC 的细胞谱图 (使用最终浓度为 0.5% 戊二醛固定, 在 80 °C 下用 SYBR Green I 染色 10 分钟, 最终稀释为 5×10^5 cells/ml). 图中的方框所选的区域为要分析的目标病毒。使用未经染色的无菌和 0.2 μ m 孔径滤膜过滤的海水作为空白对照 (Brussaard, 2004)。

Munn 通过流式细胞仪对白化 (White Syndrome) 的珊瑚礁的病毒-宿主相互作用进行研究 (Munn, 2006)。发现白化珊瑚 (图 2B) 比健康珊瑚 (图 2C) 所携带的病毒颗粒明显增加, 说明珊瑚礁白化与珊瑚中的病毒颗粒可能具有密切关系。

图 2. 流式细胞仪检测白化 (White Syndrome, WS) 珊瑚和健康珊瑚中病毒样颗粒. A. 作为参考, 培养的 EhV 病毒 (~170 nm 直径) 的散点图; B. 来自 WS 病变的珊瑚样品检测结果; C. 代表从 WS 病变前方 10 厘米处收集的健康珊瑚组织。所有珊瑚样品在染色前均经 0.2 μ m 过滤, 所以没有检测到细菌群 (Munn, 2006)。

Nicole 等将珊瑚礁水体中细菌和病毒进行 SYBR Green I 染色 (Nicole 等, 2006), 通过流式细胞术检测可以发现, 健康珊瑚水体中存在两个明显的病毒群体 V1 和病毒群体 V2, 以及低核酸含量 (LDNA) 细菌群和高核酸含量 (HDNA) 细菌群 (图 3)。说明通过

流式细胞术对珊瑚礁水体中微生物菌群和病毒群进行动态分析，可用于判断珊瑚礁的生长特性。

图 3. 一个典型的流式图显示在健康的珊瑚水体中具有细菌和病毒样颗粒 (VLP)群. 通过 FITC 标记的 1 μ m 标准荧光微球设定流式参数。根据颗粒内部结构复杂程度 (SSC) 和 DNA 含量的差异 (SYBR Green I) 可以区分两个 VLP 种群 [即病毒种群 1 (V1) 和病毒种群 2 (V2)] 和两个细菌亚群 [即高 DNA 菌群 (HDNA) 和低 DNA 菌群 (LDNA)] (Nicole 等, 2006)。

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. 蔡兰兰. (2016). [海洋浮游病毒和深部生物圈病毒的生态特性](#). 厦门大学博士学位论文.

2. Brussaard, C. P. (2004). [Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry](#). *Appl Environ Microbiol* 70(3): 1506-1513.
3. Duhamel, S. and Jacquet, S. (2006). [Flow cytometric analysis of bacteria- and virus-like particles in lake sediments](#). *J Microbiol Methods* 64(3): 316-332.
4. Fuhrman, J. A. (1999). [Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects](#). *Nature* 399(6736): 541-548.
5. 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.
6. Munn, C. B. (2006). [Viruses as pathogens of marine organisms-from bacteria to whales](#). *J Mar Biol Assoc UK* 86:453-467.
7. Nicole L. Patten, Justin R. Seymour and James G. Mitchell (2006). [Flow cytometric analysis of virus-like particles and heterotrophic bacteria within coral-associated reef water](#). *J Mar Biol Assoc UK* 86:563-566.