5t 基于荧光染料的珊瑚共生菌的群落组成及表型检测

Community Composition and Phenotypic Detection of Coral Symbiotic Bacteria Based on Fluorescent Dyes

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). 基于荧光染料的珊瑚共生菌的群落组成及表型检测 *Bio-101* e1010347. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010347.

How to cite: Lu, Y. S., Zhong, C. L., Jia, L. and Chen, J. M. (2019). Community Composition and Phenotypic Detection of Coral Symbiotic Bacteria Based on Fluorescent Dyes. *Bio-101* e1010347. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010347. (in Chinese)

摘要: 海洋珊瑚生态系统具有极高的生物多样性和经济价值, 随着珊瑚白化率的增加, 其生态系统逐渐受损, 其中与其共生的微生物参与了白化过程, 与珊瑚的白化程度密切相关。本文利用荧光染料对珊瑚共生虫黄藻和其他刺胞动物细胞群进行染色, 通过流式细胞仪对细胞群进行分类和表型检测, 对于珊瑚白化程度可进行早期检测。

关键词: 珊瑚细胞, 虫黄藻, 流式细胞术, 海洋微生物, 荧光染色

材料与试剂

1. 流式管 (美国 BD 公司, catalog number: 352054)
2. FACS Clean (美国BD公司, catalog number: 334030)
3. CS&T微球 (美国BD公司, catalog number: 641319)
4. LysoTracker Deep Red (美国Thermo Fisher Scientific, catalog number: L12492)
5. CellROX Green (美国Thermo Fisher Scientific, catalog number: C10492)
6. DAPI (美国Thermo Fisher Scientific, catalog number: D1306)
7. 台盼蓝 (Solarbio, catalog number: C0040)
8. 无水乙醇 (国药集团, catalog number: 10009259)
9. FBS (美国 Thermo Fisher Scientific, catalog number: 10100147C)

10. HEPES (美国 Thermo Fisher Scientific, catalog number: 15630080)
11. 氯化钾
12. 磷酸二氢钾
13. 氯化钠
14. 十二水合磷酸氢二钠
15. 3.3× PBS (见溶液配方)
16. 染色缓冲液 (见溶液配方)
17. 75% 乙醇 (见溶液配方)
18. DAPI 储存液 (见溶液配方)
19. CellROX Green 工作液 (见溶液配方)
20. LysoTracker Deep Red 工作液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 流式细胞仪 (美国 BD 公司, model: FACSAriaIII)
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)
5. 血球计数板
6. 高压蒸汽灭菌锅

实验步骤

1. 珊瑚样品: 本研究所用到的珊瑚来自闽江学院海洋研究院。
2. 珊瑚细胞分离: 将珊瑚碎片用小刀切成细小碎片, 用无菌海水清洗。随后将细小的珊瑚碎片放在含有染色缓冲液的培养皿中, 用注射器的柱塞轻轻研磨, 使用 40 μm 滤膜进行过滤, 去除杂质 (Khalesi 等, 2008)。

注: 研磨过程要轻且该过程应该在冰上完成, 以尽可能减少对珊瑚细胞的损伤和对细胞代谢活性的影响。

3. 珊瑚细胞收集和计数: 将分离得到的珊瑚细胞在 4 °C 下以 500 × g 离心 5 分钟, 收集细胞沉淀, 用染色缓冲液重悬。取少量细胞悬液加入台盼蓝 (死细胞着色, 活细

- 胞不着色), 使其终浓度为 0.04%, 染色 5 min 并通过血球计数板计数计算活细胞比率, 确保提取的细胞悬液中活细胞比率在 90% 以上 (Krediet 等, 2015; Rosental 等, 2017)。
4. 样品染色: 将珊瑚细胞用染色缓冲液稀释成浓度为 1×10^6 细胞/ml 的细胞悬液。取 200 μ l 细胞悬液, 加入终浓度为 0.2 μ M LysoTracker Deep Red 和 1 μ M CellROX Green 的荧光染料, 室温避光染色 30 min (Krediet 等, 2015)。
 5. 清洗: 加入 1 ml 染色缓冲液重悬细胞, 4 °C 下以 $500 \times g$ 离心 5 分钟, 收集细胞沉淀, 用 500 μ l 染色缓冲液重悬。加入终浓度为 1 mg/ml DAPI 进行核酸染色 (活细胞不着色, 死细胞着色), 以区分死细胞。
 6. 加入内参: 往染色好的样品中加入终浓度为 1% 左右的 1 μ m 标准荧光微球作为内参, 以确定目的细胞的大小和在流式图中的定位。
 7. 上样检测:
 - 7.1 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 375 nm、488 nm 和 633 nm 激光器, 建立实验模板, 选择实验所需的 DAPI、LysoTracker Deep Red (可选择 APC 染料对应的荧光通道) 和 CellROX Green (可选择 FITC 染料对应的荧光通道) 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。
 - 7.2 参数调整: 将染色完成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, 大概位于横纵坐标中间位置。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。
 - 7.3 圈门: 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 (Allam 等, 2002)。调节荧光通道的电压, 使荧光信号位于合适的位置。
 - 7.4 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 个待研究的颗粒, 以达到统计学水平。
 - 7.5 利用 BD FACSDiva 软件对仪器进行操作和数据分析。

8. 珊瑚细胞检测策略：根据FSC和SSC对细胞碎片和珊瑚细胞进行区分，圈取珊瑚细胞群，根据DAPI染料区分活细胞和死细胞，圈取DAPI阴性的活细胞群。由于很多藻类会自发荧光，因此排除细胞碎片和死细胞后，可以通过488 nm远红光通道 (755LP, 780/60BP) 检测共生藻类虫黄藻的自发荧光，以区分有或没有藻类共生细胞。

结果与分析

Rosental 等首先通过 FSC 和 SSC 排除珊瑚细胞悬液中的细胞碎片 (图 1a 实线外的区域); 通过 DAPI 染色进一步排除死细胞, DAPI 染料可以通过死细胞的细胞膜与细胞核酸结合, 从而对细胞着色, 活细胞不着色 (图 1b); 通过检测活细胞中是否存在近红外的自发荧光, 分析珊瑚细胞中是否有共生藻类, 从实验结果可以发现本实验的珊瑚细胞中存在共生藻类 *Symbiodinium* (图 1c) (Rosental 等, 2015)。

Rosental 等使用三种荧光染料 (分别为 DAPI、CellROX Green 和 LysoTracker Deep Red) 标记珊瑚细胞悬液, 通过 DAPI 阳性细胞将死细胞排除 (图 2b p1、p3), 通过是否在近红外区域有自发荧光, 发现在珊瑚细胞悬液中存在 3 群大小和荧光强度不同的共生虫黄藻 (图 2b p6、p7、p8)。通过 LysoTracker Deep Red 和 CellROX Green 标记, 从珊瑚细胞悬液中分选出 6 个细胞群 (图 2c)。在珊瑚中也存在寄生的大小不同的刺细胞生物 (图 2d)。通过流式细胞仪可以对珊瑚的生长状态及寄生的各种生物进行详细的分析和群落分选, 有助于早期发现珊瑚白化状态 (Rosental 等, 2015)。

图 1. 流式细胞仪分析珊瑚细胞群落. a.横坐标为前向散射光(Forward scatter, FSC), 主要体现检测细胞的大小, 纵坐标为侧向散射光(Side scatter, SSC), 主要体现检测细胞所含内容物的多少, 通过 FSC 和 SSC 排除细胞碎片, 左下角区域为细胞碎片及黑色实线外的区域. b.分析 a 图中排除细胞碎片后珊瑚细胞自发荧光和死细胞情况. 横坐标为珊瑚自发荧光, 纵坐标为 DAPI 染色的死细胞. c.分析 b 图中活细胞在近红外是否有自发荧光, 检测珊瑚细胞是否含有共生藻类 (Krediet 等, 2015).

图 2. 使用 DAPI、CellROX Green 和 LysoTracker Deep Red 三种荧光染料, 通过流式细胞仪从 *P. damicornis* 细胞悬液中鉴定分选得到 12 个不同的细胞亚群 (Rosental 等, 2017). a.光学显微镜图像显示未分选的手机形态. b.流式图中横坐标为 DAPI, 用以区分活细胞和死细胞, 纵坐标为珊瑚共生藻类虫黄藻的自发荧光. 通过 FSC、SSC 和自发荧光, 筛选出 3 群大小和荧光强度不同的虫黄藻 p6、p7、p8, p1、p3 为 2 群 DAPI 阳性的细胞群. 光学显微镜显示了这 5 群细胞的形态. c.将 b 图中未分群细胞进一步研究, 在 488 和 633 激发光下, 又将细胞分为 6 个群落. d.将 c 中箭头所示细胞群依据 FSC 分为 2 个细胞群 (Rosental 等, 2015).

溶液配方

1. 3.3× PBS

称取 0.66 g 氯化钾、0.792 g 磷酸二氢钾、26.4 g 氯化钠、11.814 g 十二水合磷酸氢二钠充分溶解于 1 L 超纯水 (ddH₂O)中

在 121 °C 条件下高压蒸汽灭菌半小时，待温度恢复到室温后 4 °C 保存备用

2. 染色缓冲液

取 960 ml 3.3× PBS 于 1 L 烧杯中，加入 20 ml FBS 和 20 ml 1 M HEPES 溶液，搅拌均匀即可

3. 75%乙醇

用量筒量取 75 ml 无水乙醇，然后用量筒量取 25 ml 的去离子水倒入烧杯搅拌均匀即可

4. DAPI 储存液

取 5 mg DAPI 溶于 1 ml 双蒸水中，配成 5 mg/ml 的储存液，用时稀释 5 倍，-20 °C 避光保存

5. CellROX Green 工作液

CellROX Green 原液浓度为 2.5 mM，储存于-20 °C，使用时用 PBS 稀释 2,500 倍

6. LysoTracker Deep Red 工作液

LysoTracker Deep Red 原液浓度为 1 mM，储存于-20 °C，使用时用 PBS 稀释 5,000 倍

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. Allam, B., Ashton-Alcox, K. A. and Ford, S. E. (2002). [Flow cytometric comparison of haemocytes from three species of bivalve molluscs](#). *Fish Shellfish Immunol* 13(2): 141-158.
2. Khaledi, M. K., Vera-Jimenez, N. I., Aanen, D. K., Beeftink, H. H. and Wijffels, R. H. (2008). [Cell cultures from the symbiotic soft coral *Sinularia flexibilis*](#). *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 44(8-9): 330-338.
3. Krediet, C. J., DeNofrio, J. C., Caruso, C., Burriesci, M. S., Cella, K. and Pringle, J. R. (2015). [Rapid, precise, and accurate counts of symbiodinium cells using the guava flow cytometer, and a comparison to other methods](#). *PLoS One* 10(8): e0135725.
4. Rosental, B., Kozhebaeva, Z., Fernhoff, N., Tsai, J. M. and Traylor-Knowles, N. (2017). [Coral cell separation and isolation by fluorescence-activated cell sorting \(FACS\)](#). *BMC Cell Biol* 18(1): 30.