海洋微生物中 DNA 含量的流式检测

DNA Content Analysis in Marine Microorganisms by Flow Cytometry

钟春莲^{1, #}, 卢余盛^{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: 钟春莲, 卢余盛, 贾力, 陈建明. (2019). 海洋微生物中 DNA 含量的流式检测. *Bio-101* e1010348. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010348.

How to cite: Zhong, C. L., Lu, Y. S., Jia, L. and Chen, J. M. (2019). DNA Content Analysis in Marine Microorganisms by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010348. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010348. (in Chinese)

摘要: 海洋微生物是海洋生物重要组成部分, 因其多样性增加了海洋微生物 DNA 检测的难度。我们采用流式细胞术 (Flow cytometry method, FCM), 利用碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 荧光染料与细胞内 DNA 碱基的结合, 可对海洋微生物 DNA 含量进行快速、准确的检测。

关键词: 海洋微生物, 流式细胞术, DNA 含量

材料与试剂

1. 70 μ m 细胞过滤器 (Beyogold, catalog number: FSTR040)
2. 流式管 (BD Falcon, catalog number: BD 352054)
3. 蛋白酶 K (Solarbio, catalog number: P9460)
4. 碘化丙啶 (Signalway Antibody LLC, SAB, catalog number: CA001)
5. PBS (pH = 7.2~7.4, Solarbio, catalog number: P1020)
6. 柠檬酸钠 (上海国药, catalog number: 241245)
7. Triton X-100 (Solarbio, catalog number: T8200-100ml)
8. 50% 的戊二醛溶液 (Sangon Biotech, catalog number: A500484)
9. PI (Solarbio, catalog number: P8080)
10. PI 溶液 (见溶液配方)

11. 1% 柠檬酸钠 (见溶液配方)
12. 0.1% Triton X-100 的 PI 溶液 (见溶液配方)
13. 10 ml PI 溶液 (50 $\mu\text{g/ml}$) (见溶液配方)

仪器设备

1. 流式细胞仪 (美国 BD 公司, model: FACSAriaIII)
2. 低速离心机 (中科中佳科学仪器公司, model: LX-200)
3. 小型低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司, model: 5424R)
4. -80 °C 冰箱 (中国海尔集团, model: DW-86L388)
5. 移液器 (德国 Eppendorf 公司)

实验步骤

1. 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 (Gregori 等, 2001)。
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。水样中加入浓度为 50% 的戊二醛, 使其终浓度达到 0.5%, 蛋白酶 K, 使其终浓度达到 20 g/L, 轻轻混匀, 避光固定 15~20 min (杨等, 2017)。如果样本不能在采集 12 小时内完成检测, 可用移液器转移已固定好的水样于冻存管内 4 °C 保存, 一个月内完成流式检测。若需长期保存, 需将固定好的水样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: 若为 -80 °C 冰箱保存的水样, 需将其放入 4 °C 冰箱解冻。
4. 将已准备好的水样于 12,000 $\times g$ 室温离心 10 min, 小心去除上清, 收集沉淀 (沉淀即为水样中的微生物), 若无明显沉淀可留取离心管底部液体用于后续实验 (Alapat, 2018)。
5. 用 2 ml PBS 将微生物沉淀重悬, 清洗, 12,000 $\times g$ 室温离心 5 min, 小心去除上清, 收集微生物沉淀, 此步骤重复 2~3 次。若无明显沉淀, 只需用 PBS 清洗 1 次。
6. 用 200 μl PBS 重悬步骤 5 中的微生物沉淀, 加入 1 μl PI 染料, 混匀, 室温避光染色 10 min (Zhang 等, 2018; Wu 等, 2018)。

7. 加入 2 ml PBS 重悬, $12,000 \times g$ 室温离心 10 min, 小心吸弃上清, 收集微生物沉淀。
8. 重复步骤 7, 将多余的 PI 染料去除, 预留 200 μ l 溶液上机检测。
9. 在流式细胞仪上, 先用未染色的微生物悬液设置检测参数, 调节检测电压和阴性区域。
10. 上机检测至少获取 1×10^5 的阳性细胞作后续数据分析。

结果与分析

Correia 等研究发现过氧化氢可以明显阻滞白色念球菌的细胞周期, 其 DNA 含量呈现差异表达。如图 1 所示, 横坐标表示 DNA 含量, 通过 PI 的荧光强度显示, 荧光越强, DNA 含量越高; 纵坐标表示细胞的数目。不同的峰代表处于不同的细胞周期, DNA 含量处于 $2n \sim 4n$ 。红色代表正常培养状态下每隔 15 min 检测的白色念球菌 DNA 含量, 灰色代表经 1 mM H_2O_2 处理不同时间检测白色念球菌 DNA 含量 (Correia 等, 2016)。若没有看到明显的特征峰, 则表示实验失败, 可能由于细胞破膜不充分, PI 没有和细胞内 DNA 充分结合而导致实验失败。

图 1. 过氧化氢阻滞白色念珠菌细胞周期于 G1 期。 白色念球菌在正常的培养条件和含 1 mM H_2O_2 的培养液中培养, 每隔 15 min 收集菌液, 经 0.5% 戊二醛固定, PI 染色, 流式检测其 DNA 含量。红色代表白色念球菌在正常培养条件下 DNA 含量, 灰色代表经 H_2O_2 处理后白色念球菌 DNA 含量 (Correia 等, 2016)。

溶液配方

1. PI 溶液

用 1 ml 含有 1% 柠檬酸钠的无菌水将 10 mg PI 粉末溶解, 配制成浓度为 10 mg/ml 的储存液, -20 °C 冰箱避光保存。使用时将储存液稀释 200 倍 (终浓度为 50 µg/ml), 加入 Triton X-100, 使其终浓度达到 0.1%

2. 1% 柠檬酸钠

称取 0.1 g 柠檬酸钠溶于 1 ml 无菌水中

3. 0.1% Triton X-100 的 PI 溶液

用移液器缓慢的吸取 10 µl Triton X-100 加入

4. 10 ml PI 溶液 (50 µg/ml) (Naganowska 等, 2003)

吹打混匀, 整个配制过程需避光操作

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. 杨莉婷, 何丽, 何海宁, 吴琼. (2017). [流式细胞术对生乳中微生物检测的应用研究](#). 广西师范大学学报, 2: 112-116.
2. Alapat, D. (2018). [Cytoplasmic immunoglobulin vs. DNA analysis by flow cytometry](#). *Methods Mol Biol* 1792: 35-45.
3. Correia, I., Alonso-Monge, R. and Pla, J. (2016). [The Hog1 map kinase promotes the recovery from cell cycle arrest induced by hydrogen peroxide in *Candida albicans*](#). *Front Microbiol* 7: 2133.
4. Gregori, G., Citterio, S., Ghiani, A., Labra, M., Sgorbati, S., Brown, S. and Denis, M. (2001). [Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in](#)

- [freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining](#). *Appl Environ Microbiol* 67(10): 4662-4670.
5. Naganowska, B., Wolko, B., Sliwinska, E. and Kaczmarek, Z. (2003). [Nuclear DNA content variation and species relationships in the genus *Lupinus* \(Fabaceae\)](#). *Ann Bot* 92(3): 349-355.
 6. Wu, D., Liang, M., Dang, H., Fang, F., Xu, F. and Liu, C. (2018). [Hydrogen protects against hyperoxia-induced apoptosis in type II alveolar epithelial cells via activation of PI3K/Akt/Foxo3a signaling pathway](#). *Biochem Biophys Res Commun* 495(2): 1620-1627.
 7. Zhang, N., Fan, Y., Li, C., Wang, Q., Leksawasdi, N., Li, F. and Wang, S. (2018). [Cell permeability and nuclear DNA staining by propidium iodide in basidiomycetous yeasts](#). *Appl Microbiol Biotechnol* 102(9): 4183-4191.