海洋细菌活性和膜完整性的流式检测

Assessment of the Bacterial Cell Viability and Membrane Integrity in Marine Bacteria 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). 海洋细菌活性和膜完整性的流式检测. *Bio-101* e1010349. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010349.

How to cite: Zhong, C. L., Lu, Y. S., Jia, L. and Chen, J. M. (2019). Assessment of the Bacterial Cell Viability and Membrane Integrity in Marine Bacteria by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010349. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010349. (in Chinese)

摘要: 5-氰基-2,3-二甲苯基四氮唑 (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride, CTC) 是一种氧化还原染料, 本身不带荧光。CTC 可以通过活细菌细胞膜, 被活细菌还原后, 产生红色荧光物质。碘化丙啶 (Propidium iodide, PI) 是一种核酸染料, 它不能通过完整的细胞膜, 但可以进入死细胞与细胞内的核酸结合, 使死细胞带上红色荧光。因此利用流式细胞仪检测细菌 CTC 和 PI 的荧光染色情况可以用于判断细菌的活性和细胞膜的完整性。

关键词: CTC, PI, 流式细胞术

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. 5-氰基-2,3-二甲苯基四氮唑 (CTC) (Seebio, catalog number: 182066)
4. 碘化丙啶 (PI) (Solarbio, catalog number: P8080)
5. PBS (pH = 7.2~7.4, Solarbio, catalog number: P1020)
6. CTC 溶液 (见溶液配方)

7. PI 溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 流式细胞仪 (美国 BD 公司, model: FACS AriaIII)
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)

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。
2. 水样用 70 μm 滤膜过滤, 去除杂质, 以免堵塞流式细胞仪。
3. 过滤后的水样于 5,000 $\times g$ 室温离心 10 min, 小心去除上清, 收集沉淀, 若无明显沉淀可留取离心管底部液体用于后续实验。
4. 沉淀用 400 μl PBS 重悬, 均匀分为 2 管。一管中加入 CTC 染料, 使其终浓度达到 2 mmol/L, 37 °C 避光孵育 3 h (林等, 2013; Zhang 等, 2018); 另一管中加入 1 μl PI 染料, 室温避光孵育 10 min (Nescerecka 等, 2016)。
5. 分别于 2 管菌液中加入 4 ml PBS 重悬, 5,000 $\times g$ 室温离心 10 min, 小心吸弃上清。
6. 预留 200 μl 溶液上机检测。
7. 在流式细胞仪上, 先用未染色的细菌悬液设置检测参数, 调节检测电压和阴性, 所用激光器为 488 激光器。根据前向散射光 (Forward scatter, FSC, 主要反映被测样品的大小) 和侧向散射光 (side scatter, SSC, 主要反映被测样品所含内容物的多少) 排除大于 1 μm 的藻类和其他生物的影响, 根据是否自发荧光排除微藻的影响, 上机检测至少获取 1×10^5 的阳性细胞做后续数据分析。
8. CTC (激发波长 480 nm, 发射波长 630 nm, 荧光信号位于 FL3 通道) 可以与活性菌反应, 在细胞内形成红色物质, 代谢活性越强的细菌, 产生红色荧光越强, 从而通过流式细胞仪识别检测细菌的活性。

9. 随着细菌的凋亡和坏死,细菌细胞膜的通透性逐渐增大,PI染料(激发波长480 nm,发射波长620 nm,荧光信号位于FL3通道)可以穿过细胞膜与细胞内DNA结合,通过流式细胞仪检测PI的荧光强度,判断细菌细胞膜的完整性(Shahryari等,2018)。

结果与分析

如图1所示,横坐标表示bis-oxonol荧光强度,bis-oxonol表示细胞的去极化水平,在海水中培养,细胞膜通透性变大,去极化水平升高,bis-oxonol的荧光强度越强(图1C),纵坐标表示CTC的荧光强度,在海水中加入营养成分,细胞呼吸活性增强,CTC荧光增强(图1D)(Lopez-Amoros等,1997)。

图1. 大肠杆菌在海水中饥饿状态和加入营养成分呼吸活性和细胞膜去极化水平检测。大肠杆菌培养在海水中,在是否存在营养成分的条件下培养,收集菌液,CTC和bis-oxonol染色。横坐标表示bis-oxonol荧光强度,纵坐标表示CTC的荧光强度,流式图以等高线图显示,密度代表细胞数量(Lopez-Amoros等,1997)。

如图2所示,横坐标为Annexin V的荧光强度,Annexin V是一种检测细胞凋亡的试剂,在正常细胞中,磷脂酰丝氨酸(PS)只分布在细胞膜脂质双层的内侧,细胞发生凋亡早期,膜磷脂酰丝氨酸由脂膜内侧翻向外侧。Annexin V作为一种磷脂结合蛋白,与磷脂酰丝氨酸有高度亲和力,它通过细胞外侧暴露的磷脂酰丝氨酸与凋亡早期细胞的胞膜结合。纵坐标为PI的荧光强度,即死细胞的含量,Q1为PI阳性区域。当细胞膜完整时,PI染料很难透过细胞膜与胞内DNA结合,Q1区域阳性细胞很少(图1在buffer溶液中的细胞);当细胞膜破损,PI可以通过细胞膜与死细胞内的核酸结合,PI阳性的细胞增多(图1中经 Cu^{2+} 、KCTD1、KCTD1+ Cu^{2+} 处理的细胞),因此,可通过PI阳性

的多少检测细胞膜的完整性 (Liu 等, 2016)。

图 2. KCTD1 在 Cu^{2+} 存在条件下发生聚集引起更多的细胞凋亡. 将 $0.4 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 KCTD1 蛋白单独或与 $20 \mu\text{M}$ CuSO_4 于 37°C 共孵育 2 h 后加入 Huh7 细胞培养基中培养 36 h 后收集细胞, 于 Annexin-V 和 PI 共染色后流式检测细胞凋亡情况。横坐标 Annexin V 代表早期凋亡的细胞 (Q3 区域), 纵坐标 PI 代表细胞膜破损后死亡的细胞 (Q1 区域), Q2 代表晚期凋亡的细胞 (Liu 等, 2016)。

溶液配方

1. CTC 溶液

用无菌水将 CTC 染料配制成浓度为 10 mmol/L 的储存液, 避光- 20°C 保存, 使用浓度为 2 mmol/L

2. PI 溶液

用 1 ml 无菌水将 10 mg PI 粉末配制成浓度为 10 mg/ml 的储存液, -20°C 冰箱避光保存, 使用浓度为 $50 \mu\text{g/ml}$

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. 林怡雯, 杨天, 李丹, 等. (2013). [基于 CTC-流式细胞仪活性细菌总数的快速检测](#)

- [技术研究](#). 环境科学学报, 33(9): 2511-2515.
2. Liu, Z., Song, F., Ma, Z. L., Xiong, Q., Wang, J., Guo, D. and Sun, G. (2016). [Bivalent copper ions promote fibrillar aggregation of KCTD1 and induce cytotoxicity](#). *Sci Rep* 6: 32658.
 3. Lopez-Amoros, R., Castel, S., Comas-Riu, J. and Vives-Rego, J. (1997). [Assessment of *E. coli* and Salmonella viability and starvation by confocal laser microscopy and flow cytometry using rhodamine 123, DiBAC4\(3\), propidium iodide, and CTC](#). *Cytometry* 29(4): 298-305.
 4. Nescerecka, A., Hammes, F. and Juhna, T. (2016). [A pipeline for developing and testing staining protocols for flow cytometry, demonstrated with SYBR Green I and propidium iodide viability staining](#). *J Microbiol Methods* 131: 172-180.
 5. Shahryari, S., Zahiri, H. S., Haghbeen, K., Adrian, L. and Noghabi, K. A. (2018). [High phenol degradation capacity of a newly characterized *Acinetobacter* sp. SA01: Bacterial cell viability and membrane impairment in respect to the phenol toxicity](#). *Ecotoxicol Environ Saf* 164: 455-466.
 6. Zhang S, Guo L, Yang K, Zhang Y, Ye C, Chen S, Yu X, Huang WE, Cui L. (2018) [Induction of *Escherichia coli* into a vbnc state by continuous-flow uvc and subsequent changes in metabolic activity at the single-cell level](#). *Front Microbiol* 9:2243.