基于不同类型海洋微藻所含色素成分差异的流式分群分析

Marine Microalgae Pigment Analysis 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). 基于不同类型海洋微藻所含色素成分差异的流式分群分析. *Bio-101* e1010351. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010351.

How to cite: Zhong, C. L., Lu, Y. S., Jia, L. and Chen, J. M. (2019). Marine Microalgae Pigment Analysis by Flow Cytometry. *Bio-101* e1010351. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010351. (in Chinese)

摘要: 藻类植物的主要特征为细胞内含有大量的色素, 因其含有色素种类和数量的不同, 不同的藻类呈现不同的颜色, 因此色素以其特征显著用于微藻群落的分析。本文通过流式细胞仪检测海洋微藻中含有的特征色素成分差异可实现对大批样品中微藻种类鉴定和数量分析的初步研究。

关键词: 海洋微藻, 色素, 流式细胞仪

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. 三角瓶
4. 原绿球藻 (Divinyl chlorophyll a、b)
5. 甲藻 (多甲藻黄素, Peridinin)
6. F/2-Si 培养基 (Elite-Media, catalog number: M1197-02)
7. F/2 微量元素溶液 (Elite-Media, catalog number: A345-01)
8. F/2 维生素溶液 (Elite-Media, catalog number: A346-01)
9. PBS (pH = 7.2~7.4, Solarbio, catalog number: P1020)
10. NaNO₃

11. $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
12. Na_2EDTA
13. $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
14. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
15. $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
16. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
17. $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
18. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
19. 维生素 B12
20. 盐酸硫胺素
21. 生物素
22. F/2-Si 培养液 (见溶液配方)
23. 微量元素溶液 (见溶液配方)
24. 维生素溶液 (见溶液配方)

仪器设备

1. 光照培养箱 (哈尔滨东联电子技术开发有限公司, model: HPG-280B)
2. 高压灭菌锅 (德国爱安姆高压灭菌器, model: L65)
3. 流式细胞仪 (美国 BD 公司, model: FACS ArialII)
4. 低速离心机 (中科中佳科学仪器公司, model: LX-200)
5. 小型低温高速离心机 (德国 Eppendorf 公司, model: 5424R)
6. -80°C 冰箱 (中国海尔集团, model: DW-86L388)

实验步骤

1. 以原绿球藻 (Divinyl chlorophyll a、b) 和甲藻 (多甲藻黄素, Peridinin) 为实验样本。
2. 将 2 种藻类的藻种分别培养于含有 100~150 ml F/2-Si 培养基的 250 ml 的三角瓶中, 放置在光照培养箱中。光照强度为 $50 \mu\text{mol photon m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Hazeem 等, 2019)。

3. 待藻类生长到对数生长期 (增殖最快), 分别取 2 种藻液 5 ml 进行后续实验。组 1: 2.5 ml 原绿球藻, 组 2: 2.5 ml 甲藻, 组 3: 2.5 ml 原绿球藻和 2.5 ml 甲藻的混合液。将 3 组藻液 $300 \times g$ 室温离心 5 min, 弃上清。
4. 于藻类细胞沉淀中加入 4 ml PBS, 用移液枪吹打混匀, $300 \times g$ 室温离心 5 min, 弃上清, 预留 200 μ l 液体, 经 70 μ m 滤膜过滤后流式细胞仪检测。
5. 在流式细胞仪上, 选用 488 激光器, 分别选用 1 μ m 不带荧光和 FITC、PE 标记的荧光微球 (用于荧光定量) 调节检测电压和荧光的阴性和阳性区域 (Barteneva 等, 2019)。上机检测至少获取 1×10^5 的阳性细胞作后续数据分析。
6. 不同藻类所含特征色素不同, 原绿球藻含有大量的叶绿素, 因此呈现绿色 (488 nm, 发射波长 585 nm, 检测通道 FL2); 甲藻因多甲藻黄素的含量不同呈现出黄色、棕色甚至是红色 (激发波长 488 nm, 发射波长 680 nm, 检测通道 FL3)。因此可通过其在流式细胞仪荧光区域的不同, 实现对两种藻类植物快速、初步的分群研究 (Bustillos-Guzman 等, 2014; Dashkova 等, 2016)。

结果与分析

在绿色微藻-小球藻中存在多种荧光色素, 如叶绿素、类胡萝卜素和虾青素等, 主要呈现肉眼可见绿色和红色。Chen 等研究发现, 在兼养的条件下, 小球藻中存在两种不同的荧光色素花青素和叶绿素, 在 FL1 (533 nm) 和 FL2 (585 nm) 通道都呈现明显的荧光, 且细胞大小也出现明显变化, 呈现两种大小和色素含量不同的细胞群 M1 和 M2 (图 1A 和 1C)。前向散射角 FSC 显示, M1 细胞群的细胞尺寸较 M2 细胞群的细胞尺寸小, 纵坐标显示 M1 细胞群所含花青素和叶绿素较 M2 细胞群的含量低。通过流式细胞仪可以对微藻所含色素进行快速的定性分析, 此外通过标准荧光微球界定荧光的阴性和阳性区域可实现对微藻荧光的定量分析 (Chen 等, 2017)。

图 1. 流式分析兼养型小球藻的荧光色素分布. 小球藻在兼养的条件下培养 24 h, 离心收集藻液, 流式细胞仪检测其含有的色素成分。**A.**和 **C.**横坐标为 FSC, 显示细胞的大小, 纵坐标 FL1 为小球藻含有的虾青素自发荧光, FL2 为小球藻含有的叶绿素自发荧光;**B.**和 **D.**横坐标代表不同的荧光, 纵坐标代表细胞数目 (Chen 等, 2017)。

溶液配方

1. F/2-Si 培养液

取天然海水经 0.45 μm 微孔滤膜过滤后定容到 1 L, pH 调至 8.2, 高压灭菌 30 min 待冷却后加入 NaNO_3 (0.075 g)、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.00565 g)、1 ml 微量元素溶液和 1 ml 维生素溶液

2. 微量元素溶液

1 L 无菌水中依次加入 Na_2EDTA (4.16 g)、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (3.15 g)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.01 g)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.022 g)、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.01 g)、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (0.18 g)、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.006 g), 每种成分完全溶解后再加入下一种成分过滤除菌, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存

3. 维生素溶液

1 L 无菌水中加入维生素 B12 (0.0005 g)、盐酸硫胺素 (0.1g)、生物素 (0.0005 g)，过滤除菌，4 °C 保存

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. Barteneva, N. S., Dashkova, V. and Vorobjev, I. A. (2019). [Probing complexity of microalgae mixtures with novel spectral flow cytometry approach and “virtual filtering”](#). *BioRxiv*.
2. Bustillos-Guzmán, J., Gárate-LizLrrága, I., López-Cortés, D. and Hernández-Sandoval, F. (2004). [The use of pigment “fingerprints” in the study of harmful algal blooms](#). *Rev Biol Trop* 52 (Suppl.1): 17-26.
3. Chen, J., Wei, D. and Pohnert, G. (2017). [Rapid estimation of astaxanthin and the carotenoid-to-chlorophyll ratio in the green microalga *Chlorella zofingiensis* using flow cytometry](#). *Mar Drugs* 15(7).
4. Dashkova, V., Segev, E., Malashenkov, D., Kolter, R., Vorobjev, I. and Barteneva, N. S. (2016) [Microalgal cytometric analysis in the presence of endogenous autofluorescent pigments](#). *Algal Research* 19: 370-380.
5. Hazeem, L. J., Kuku, G., Dewailly, E., Slomianny, C., Barras, A., Hamdi, A., Boukherroub, R., Culha, M. and Bououdina, M. (2019). [Toxicity effect of silver nanoparticles on photosynthetic pigment content, growth, ROS production and ultrastructural changes of microalgae *Chlorella vulgaris*](#). *Nanomaterials (Basel)* 9(7).