

流式细胞术在海洋浮游植物研究中的应用

APPLICATIONS OF FLOW CYTOMETRY (FCM) IN MARINE PHYTOPLANKTON RESEARCH

王 斌¹ 薛玮珏²

(¹ 华东师范大学河口海岸国家重点实验室 上海 200062)

(² 华东师范大学生物系 上海 200062)

传统的海洋浮游植物研究已经积累了许多形态学与分类学知识。但是对其生态学, 以及微型浮游植物的研究^[1], 则由于技术限制而有所不足。80年代中期以来, 国际上已开始把流式细胞术(Flow Cytometry, FCM)应用于海洋浮游植物研究, 很大程度地弥补了传统浮游植物研究方法的种种不足^[3]。流式细胞术首先应用在细胞生物学及医学等领域。它集中了现代流体力学、激光光学、精密机械电子及电子计算机等多种先进技术, 可以对各种生物细胞群体进行快速、实时及多参数测定^[1]。本文简要介绍了流式细胞术的原理及测定方法, 及其在海洋浮游植物研究中的应用及进展。

1 流式细胞术测定的方法与原理

1.1 采样及样品测定方法

用于测定的浮游植物样品的采集方法与一般海洋生物学研究中的方法基本相同, 因为流式细胞术测定的生物细胞必须处于单细胞悬浮液状态, 所以单细胞的海洋浮游植物样品可以直接进行测定, 也可经液氮冷冻保藏后测定, 采集的水样须用滤膜过滤并避光保存以确保荧光的暗吸收。流式细胞仪本身还须用标准荧光微球进行校准。测定时对仪器需设定合适的测定阈值、参数组合及放大模式, 从而获得所需的特定信息。测定所得数据都是相对值, 只能用于相对大小比较, 如想得到测定样品的绝对数值, 必须通过测定标准荧光微球或制作标准曲线, 再换算出绝对值。

1.2 流式细胞仪的主要组成系统

流式细胞仪主要由液流系统、光学检测系统和信号处理系统组成。液流系统可以使浮游植物细胞与其周围的蒸馏水形成同轴且稳定的液流, 并可在12~60 $\mu\text{l}/\text{min}$ 间调节流速, 从而使每个细胞以相等时间依次通过检测室, 如图1所示。光学检测系统产生激光束, 穿过一系列光学镜头后在检测室内被聚焦成一个椭圆

圆形光斑。被测细胞通过光斑时受到激发, 发射出3种激发荧光, 包括绿荧光、红橙荧光和红荧光, 同时还产生不同方向的光散射, 主要是正前方的前角散射和侧面的侧向散射。上述光信号分别被各自的光电二极管或光电倍增管探测到, 经信号处理系统放大并转换数字信号, 在仪器配置的电子计算机上处理。计算机同时对仪器状态设置及监控, 并对测定数据进行单参数或多参数的定性及定量分析, 以图形显示或打印输出。

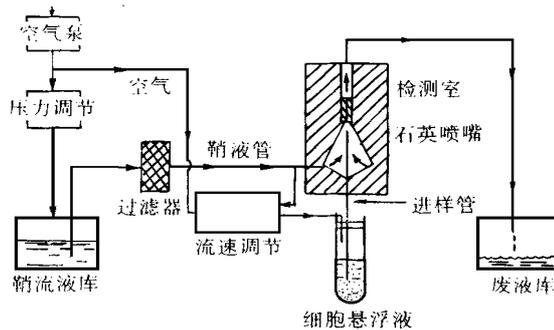


图1 流式细胞仪液流系统

1.3 流式细胞术对海洋浮游植物测定的原理概述

海水中的颗粒物包括悬浮的泥沙、有机碎屑颗粒、浮游植物和浮游动物等, 这些物质表面及内部结构中性质不同的生物化学物质在激光的激发下, 会产生不同波长及强度的光散射与荧光, 而光的强度又与其相应的生化物质含量成正比, 这就是流式细胞术获取浮游植物细胞特定信息的基础, 这些生物细胞特征如表1所示。特别是不同门类的浮游植物细胞内共含有近30种光合色素^[2], 这些色素在激发光下能产生不同特征的荧光信号, 于是流式细胞术就可以根据这

收稿日期: 1997-02-23

些信号特征将它们分别定性定量地测定出来。

表 1 流式细胞术测定的生物细胞特征

光学参数	细胞结构特征	细胞功能特征
光散射	细胞大小及形态	生物氧化还原状态
	细胞折光系数	
	生物光学性质	
	细胞亚显微结构	
激发荧光	植物光合色素	微生物发光
	蓝藻色素	细胞膜流动性
	蛋白质含量	细胞表面电荷
	死活细胞判别	细胞内 pH 值
	DNA 及 RNA 定量	细胞内膜电位
	硝化细菌	酶活性
	细胞内含物	细胞膜渗透性
	细胞代谢物质	DNA 合成
	细胞表面抗原	细胞内受体
	染色质结构	

1.4 流式细胞术较传统方法所具备的技术优势

流式细胞术除能对多种生物细胞特征测定外,还有许多传统方法不具备的优势,概括如下:(1)高效率。流式细胞术每秒测定细胞数量可达 1 000~ 5 000 个,这就保证能获得生物细胞群体特征,进而得到统计学意义的数字,因而特别适宜生态学等需要获取生物群体特征信息的研究。(2)高灵敏度及分辨率,流式细胞术测定的每个细胞只要带有 1 000~ 3 000 个荧光分子就可以被检出,两个细胞之间有 5% 的差异就可以被区分出来。(3)高精度度,流式细胞术测定的数据变异系数很小,因而数据的可重复性好。(4)多参数相关分析,流式细胞术对任何水样的一次测定,就可以同时获取其中的各种浮游植物及其色素在 5 个光信号上的测定数据,通过软件对这些数据进行彼此之间的组合分析,可获得浮游植物的多种信息。(5)流式细胞术能够测定细胞直径在 2~ 50 μm 间的浮游生物,如蓝藻和原绿藻,因此增加了对这些在海洋初级生产力中占有重要地位的微型浮游植物类群的了解。(6)流式细胞术对被测样品的预处理非常简便,可以直接测定活细胞,从而获得自然状态下生活细胞的真实数据。(7)流式细胞术实时快速的测定方式特别适用于大尺度水域,以及对浮游植物时空分布动态的调查研究。

2 流式细胞术在海洋浮游植物的研究应用

2.1 浮游植物及水生细菌个体计数

利用流式细胞术可以对浮游植物个体进行快速、简便而准确的计数。因为浮游植物被测定时,其细胞一个接一个地通过检测室,单位时间内记录其红色荧光信号(对应于细胞叶绿素),可以得到浮游植物细胞的数量,再记录测定时的液流速率,可进一步得到单位体积水样中浮游植物个体的数量。此外,据 Monfort 等(1992)报道,经 DAPI 荧光染色剂染色后,流式细胞术还可以对水域中的细菌进行计数。

2.2 浮游植物大小形状及表面结构的粗略判断

流式细胞术可对浮游植物细胞的大小及形状作出粗略判断,因为细胞大小及形状不同,它们的光散射信号特征及测定数据大小也不同。一般来说,细胞越大,测定的前角散射值也越大,而侧向散射测定值与被测细胞表面特征有关,如果浮游植物细胞表面有某些特殊结构,如钙质片或鞭毛等,就可以得到较强的侧向散射值。

2.3 浮游植物种类及群落组成

流式细胞术可获得浮游植物细胞多个光信号数据,而不同种类的浮游植物一般不可能在每个测定数据上都相同,所以利用其中一个或多个数据的差异,就可以把自然状态下的浮游植物群落中的不同种类区分开来。利用这些测定数据,可以首先把水样中的浮游植物细胞与泥沙颗粒及细菌等区分开来,对于分类学关系接近的浮游植物,可以用多个光信号测定数据之间进行组合分析,即利用它们在某一特定测定值上的区别,将它们区分开来。Yentsch(1990)利用两个光散射测定值,将混合的 6 种浮游植物种群都区分出来。

2.4 浮游植物生理生态学研究

流式细胞术也能应用于浮游植物生理生态学的研究。Knoechel 等(1989)使用流式细胞术结合放射性自显影技术,研究了海洋浮游植物不同增长时期的碳摄取及代谢的动力学特征。Dorsey 等(1989)使用流式细胞术测定藻类细胞,将数据与碳同位素标记法测定其光合作用能力的结果比较,结果两者之间存在合理的相关关系。还可以考虑用特定的蛋白质与脂类的荧光染色剂对浮游植物细胞染色后测定,从而得到作为浮游动物食物的浮游植物营养成分数据。

2.5 大尺度水域浮游植物调查

流式细胞术已成为大规模海洋调查研究中的重要技术方法。Veldhuis 等(1993)已使用该技术调查了

大西洋西部亚速海及百慕大海域,大西洋东部冰岛以南广大海域的浮游植物,并进行了微型浮游植物的区系分析。在荷兰印度洋海洋项目(DIOP)中,Veldhuis等(1992)还使用流式细胞术对红海及索马里湾近岸水域中浮游植物的组成、垂直与空间分布、生物量和生产力等进行了测定,发现各种微型浮游植物组成及荧光特征与水域的理化环境有特定的联系。

3 流式细胞术在浮游植物研究中的技术进展及其应用前景

3.1 测定技术上的进展

如上所述,流式细胞术已经在海洋浮游植物研究中得到广泛应用。当然,由于这种技术应用尚处于起步阶段。因此还存在诸多技术上的限制与不足。首先,对瞬间获取的大量数据所代表的信息还缺乏足够分析,对于这种状况,Demers, S. 等(1992)已经提出诸如使用神经网络计算方法或多元分析方法的解决方案,从而获得了浮游植物种类及数量在时间上动态变化的信息。此外,逐步开发流式细胞术测定浮游植物使用的免疫标记物,可获得更多的浮游植物细胞生理方面的信息。

3.2 仪器设计上的进展

针对现有流式细胞仪是“零”分辨率的仪器,对被测细胞形状的分辨能力有所不足,已设计出双波长激光束,甚至三波长激光束的流式细胞仪,或者增加狭缝扫描技术,使之在被测细胞形状等方面获取信息的

能力大大提高。有的流式细胞仪还可以增加分选功能,能够把测定的同一水样中不同的浮游植物细胞快速分离到各自的容器中,这种功能在浮游植物的单种培养或纯培养中的价值是显而易见的。

3.3 光学浮游生物分析仪

依据流式细胞术的基本原理,Dubelaar 等 1989 年还设计开发出全新的专门适用于浮游生物研究的流式细胞仪,称为光学浮游生物分析仪(Optical Plankton Analyzer, OPA)。该仪器在现有商品流式细胞仪的基础上改造,使之对浮游生物细胞及其群体的分析扩大到直径 0.5~ 500 μm 的范围,其液流速率最低可至 4 $\mu\text{l/s}$,以适用于水样中浮游生物含量很低时的情况。

总之,随着上述光学浮游生物分析仪及类似仪器的开发成功,流式细胞术在海洋浮游植物研究中的应用价值将越来越大,直至最后发展成为浮游生物研究中的通用手段。

主要参考文献

- 1 宋平根、李素文. 流式细胞术的原理和应用. 北京: 北京师范大学出版社, 1992. 2~ 67
- 2 巴恩斯, R. S. K. 等著, 王珍如等译. 海洋生态学导论. 北京: 地质出版社, 1990. 27~ 31
- 3 Hofstraat, J. W. and Vanzeijl, W. J. M. . *Journal of Plankton Research*, 1994, 16(9): 1 197~ 1 224