

流式细胞术对微微型浮游植物识别初探^{*}

张利华 张 经 晁 敏

(华东师范大学河口海岸国家重点实验室 上海 200062)

摘要 利用流式细胞术对东、黄海水域中微微型浮游植物进行识别测量的初步探讨。实验结果表明,可以直接利用细胞内含有的不同色素,经氩离子激光器 488 nm 波长的蓝光激发产生的自发荧光,通过 FACS can 流式细胞仪进行识别。进一步的研究可以建立近岸生物群体分布和丰度研究的实验分析方法。

关键词 流式细胞术,微型浮游植物,自发荧光

海洋微型和微微型浮游植物在近年被发现是初级生产者的重要组成部分,它们是水域营养能与食物网中一个不可缺少的基本环节,它们数量的多寡是水域初级生产力的一个重要指标。对它们的测量传统上通常是利用显微镜,根据观察到的微型植物的形态来对它们进行识别和计数。这样的观察手段,使得以往的研究限制了对微型尤其是微微型浮游植物的分类、大小、活性和数量的测量,阻碍了这一领域的研究进程^[2]。

流式细胞术(Flow Cytometer 简称 FCM)是 70 年代发展起来的一种高新细胞分析技术,自问世以来,便被广泛地应用于生物和医学研究的各个领域。80 年代流式细胞术进入了海洋学的研究^[3],为分析海洋浮游植物群落,特别是微型植物提供了一种有用的工具^[4,5]。在国内该技术在微型浮游生物研究的应用尚比较少^[1]。本文即是使用流式细胞仪,根据海洋中微微型浮游生物的自发荧光进行有效快速识别的尝试。

1 材料和方法

1.1 样品采集

样品采自 2000 年 10 月“东方红-2”航次考察的东、黄海海域。海水样品用 CTD rosette (Sea-Bird 910-Plus) 采样器采集,直接转移到棕色瓶中,并立即进行现场流式细胞测量。以 E7 站(29°24.82' N; 125°04.88' E)海水样品为本文实验样品。

1.2 实验材料及用品

微量移液器:用于标准物的 10~100 μ l 的微量移液器;用于样品制备的 100~1 000 μ l 的微量移液器。非生物基准物:Polysciences 公司的 1.002 μ m 的标准大小黄绿荧光微球(用于仪器参数的设定和样品的

内标)。超声波粉碎机(用于标准微球)。旋涡混合器(用于待测样品制备)。

1.3 试剂 标准样品的准备和待测样品的处理

1.3.1 鞘液 以华东师范大学自制的纯净水经 Milli-Q 系统(终端过滤器孔径为 0.22 μ m)制备而成,超净水电阻率为 18.2 $M\Omega \cdot cm$ 。

1.3.2 内标工作液的准备 于 2 ml milli-Q 水中加 1 滴(约 20 μ l) Polysciences 公司的 1.002 μ m 的标准大小黄绿荧光微球,在旋涡混匀器混合均匀,再稀释 100 倍,作为内标微球的工作液。工作液浓度为 7.7×10^5 个/ml。

1.3.3 待测样品处理 将采集海水用 20 μ m PT 膜(上海医工院生产)过滤除去大颗粒物质,取 1 ml 滤液加 20 μ l 内标微球工作液,在旋涡混匀器混合均匀,待测。

2 流式细胞测量

2.1 仪器基本配置

测量仪器选用美国 BD 公司的 FACScan 流式细胞仪。基本配置:488 nm 激发波长、激发光斑 20 μ m $\times$ 64 μ m、荧光检测波长分别为:绿荧光(FL1) 530 $\pm$ 20 nm;橙荧光(FL2) 585 $\pm$ 45 nm;红荧光(FL3) >630 nm。

2.2 仪器参数的设定

Polysciences 公司的 1.002 μ m 的标准大小黄绿荧

^{*} 国家重点基础研究专项经费资助项目 G19990437 号。
第一作者:张利华,出生于 1947 年,高级实验师。E-mail: lhzhang@yahoo.com.cn

收稿日期:2001-06-20;修回日期:2001-11-20

光微球设定仪器的各种参数。阈值 FL3=103。FL1 光电倍增管 (FL1 PMT) 电压为 704 V、FL2 光电倍增管 (FL2 PMT) 为 479 V、FL3 光电倍增管 (FL3 PMT) 为 674 V;侧向散射光电倍增管(SSC PMT)为 289 V.前向散射硅二极管(FSC)为 E01。所有 5 个参数的检测器,其增益都设定为对数放大 (log)。光补偿分别为: FL2 - FL1 = 20.9 %、FL3 - FL2 = 10.8 %。

2.3 测量数据的采集

用 Cell - Quest 软件采集测量数据,并以 List Mode 方式贮存于样品的文件中。待测样品分别上机进行 2 种散射光强度 (前向散射 FSC 和侧向散射 SSC) 和 3 种不同波长的自发荧光强度 (FL1- 绿荧光、FL2- 橙荧光和 FL3- 红荧光) 的测量。每个样品 3 个重复,每次测量 5 min。

2.4 本底数据的测量

用测量样品时的仪器状态进行鞘液的测定,其测量值是实验的本底值。样品数据的分析在去除本底后进行。

3 实验结果的显示、分析和讨论

3.1 不同的“阈”对测量的影响

阈是仪器对测量数据选择性获取的依据。仪器对“阈”可以有 5 种 (FSC、SSC、FL1、FL2 和 FL3) 不同的参数供选择。根据实验的目的,可以选择其中的一种。对 E7 站海水样品用不同的“阈”分别测量 1 min 的实验结果进行比较可以看出,当以 FSC 为“阈”时,测得的颗粒数达 60 多万个,其数据的文件量达到 7.1 M,而欲测的微型浮游植物细胞 (或称为靶细胞) 仅占总颗粒数的 0.02 %。选用 FL3 为阈时,测得近 3 000 个颗粒,其中靶细胞占 17.5 %。可见以 FL3 为“阈”时

微型浮游植物细胞出现的频数远远地高于以 FSC 为“阈”时靶细胞出现的频数。因此,在对海水中的微型浮游植物进行识别时,选用它的特征参数 FL3 为阈,不仅可以排除海水中大量的非浮游植物的其他生物、碎屑、泥沙颗粒等大量非靶细胞和噪声的干扰信号,而且可以节省大量的计算机储存空间,获得较为理想的实验效果。

3.2 “光补偿”对测量的必要

“光补偿”的作用是使每一个荧光检测器只检测一种物质的荧光。

图 1 是 910 型荧光分光光度计检测 3 种不同物质的发射光谱曲线。由图可见, FITC (Fluorescein isothiocyanate, 异硫氰基荧光染料, 蛋白质的荧光染料)、Chl (叶绿素) 和 PE (藻红蛋白) 的荧光发射光谱相互重叠,因而流式细胞仪的每个光电倍增管实际检测到的都是两种或几种荧光之和,只不过是某一物质的荧光为主。利用流式细胞仪的“光补偿”功能,可以调节到每一个检测器以只检测一种物质的荧光为主。

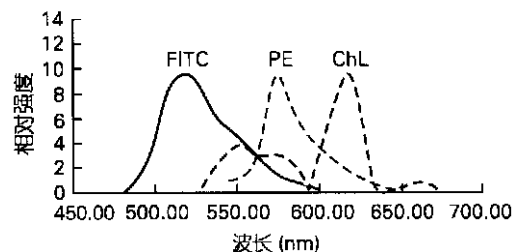


图 1 FITC、PE、Chl 的发射光谱曲线

Fig.1 Emission spectrum curves of PE and Chl

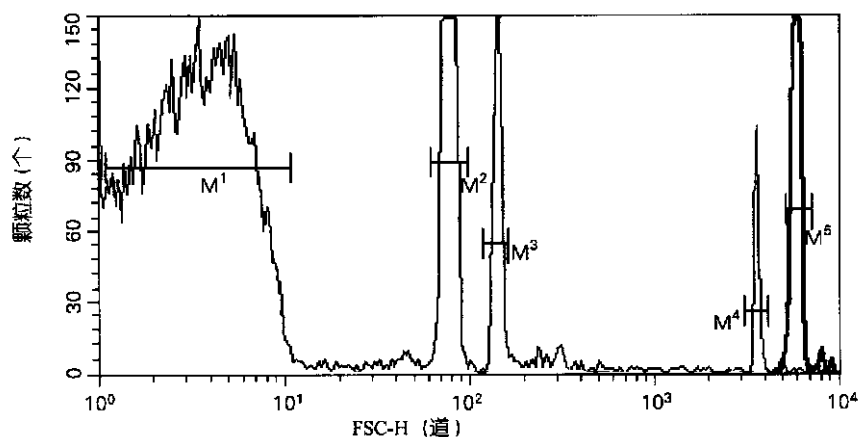


图 2 Polyscience 公司的黄绿色荧光微球的 FSC 单参数直方图

FSC:颗粒的相对大小(道)

Fig.2 Monoparameter histogram of FSC of Yellow Green fluorescence beads (Polysciences)

在微小型浮游植物细胞内,常含有藻红素、叶绿素以及辅助色素等多种细胞色素,因此当需要了解浮游植物细胞的荧光特性和各种细胞色素的含量时,必须对3个检测器进行“光补偿”设置。这样才能获得细胞内某一种色素含量(一种荧光强度)的准确结果。

在本实验中使用 Polysciences 公司的 $1.002\ \mu\text{m}$ 的标准大小黄绿荧光微球,将“光补偿”调节到 FL2PMT,只测定藻红素,FL3PMT,只测定叶绿素。

3.3 内标基准物的选择

美国 Polyscience 公司的黄绿色荧光微球,可以作为海洋微小型浮游植物识别的基准物^[6]。

图2是5种不同大小粒径的微球 FSC 的测量结果,5个峰依次为 $0.497, 1.002, 2.139, 6.0, 7.9\ \mu\text{m}$,其测量离散度依次为 $36.0\%, 6.7\%, 3.9\%, 2.3\%, 3.0\%$ 。其中 $0.497\ \mu\text{m}$ 的微球,由于其离散度大(CV值为 36%),以它作为内标时会与 *Synechococcus*, *Prochlorococcus* 的信号相重叠,因此作者选用了 $1.002\ \mu\text{m}$ 的微球作为内标基准物。

3.4 细胞亚群的设定

在开放式寡营养海洋中微小型浮游植物样品中细胞可分成3部分(3类群): *Synechococcus* (聚球藻), *Prochlorococcus* (原绿球藻) 和 *Eukaryotic picophytoplankton* (真核微小型浮游生物)。

如果样品中有内标微球时,应该区分出4个类群^[5]。

对于来自东、黄海 E7 站的样品(图3)。将标准物(Polysciences 公司, $1.002\ \mu\text{m}$ YG 微球)加于样品中。在图3A(以 FSC 与 FL3 的二维点图),不能直接区别各细胞的类别,唯有内标微球能与所有的浮游生物明显区分,因为它的位置是已知的(在仪器参数设定时确定的)。因此通过它来设门(GATE)分析。如图3B,将所有测量细胞以前向散射(FSC)对橙荧光(FL2)作二维点图,以内标微球(含有绿荧光和橙荧光的微球)为分界,设定为二个门——GATE1 和 GATE2。GATE1 内的细胞为 R1 细胞, GATE2 内的细胞为 R2 细胞。R1 细胞是有橙色荧光的细胞, R2 细胞缺乏橙荧光。这时,再将 R1 细胞以前向散射(FSC)对叶绿素(FL3)作二维点图,在图3C中,出现两个亚群 R3 和 R4, 其中 R4 是 $1.002\ \mu\text{m}$ 的内标微球。在图3D中以 R2 细胞的前向散射对叶绿素作二维点图,这时又有很好的分离。可以出现 R5、R6 二个亚群。此刻,寡营养海洋中微小型浮游植物被很好的分辨设定了。

4种类群已被明确,对它们的大小(FSC)和光学性质(FL2、FL3)的分析可以进一步确定这4种亚群的类别。

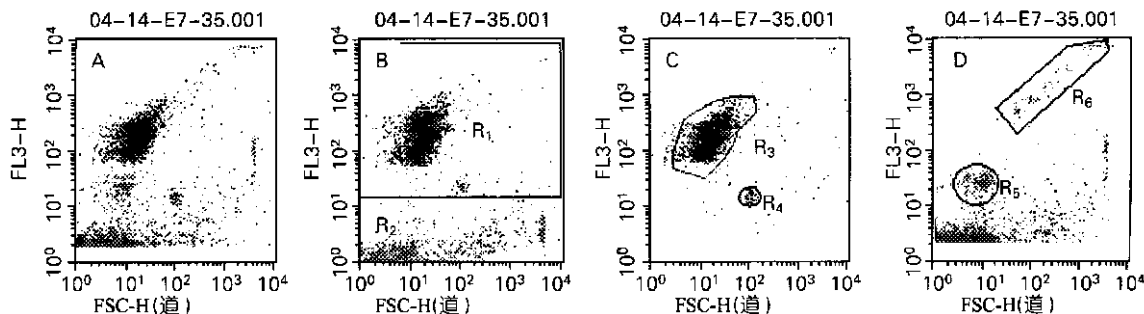


图3 细胞亚群的设定

FSC:细胞相对大小;FL3:细胞内叶绿素相对含量;FL2:细胞内藻红素相对含量

Fig.3 Region setups of cell subgroups

(图3A)在前向光散射(FSC)对红荧光(FL3)绘制的二维点图中,群体间彼此难以区分。这种信号的阈依据红荧光,而排除了大多数无叶绿素荧光的颗粒。(图3B)以 FSC 对橙荧光(FL2)用同样的测定数据作二维点图,以内标微球为标准,就能绘制出具有高强度橙荧光颗粒和具低橙荧光颗粒分开的分界图(R1 和 R2)。(图3C和D)是在 FSC 对红荧光将两个亚群分别绘制的二维点图,解决了所有4种类群的分离。*Synechococcus* (R3) 和内标基准物(R4)在图3C窗内显示。在图D中,真核生物(R6)和 *Prochlorococcus* (R5)彼此分离,并在图基线附近与非荧光颗粒(靠近原点的实验本底信号)分离。

3.5 各亚群细胞的识别

已被设定的4种类群,进一步应用“逻辑函数”对它们的各个参数的相对测量值进行统计计算,以判别它们是属于哪一类群的微型植物。图4是以东、黄海 E7 站水深为 35 m 处的一个样品为例绘制的测量

细胞各参数的相对强度单参数直方图。图4A是 FSC 直方图,图4B和图4C分别是细胞亚群的 FL2 和 FL3 单参数直方图,纵坐标(Counts)为细胞出现的频数,以“个”表示。横坐标为各参数的相对强度,数值大小以“道数”表示,越向右,其数值越大。通过各细胞亚群在

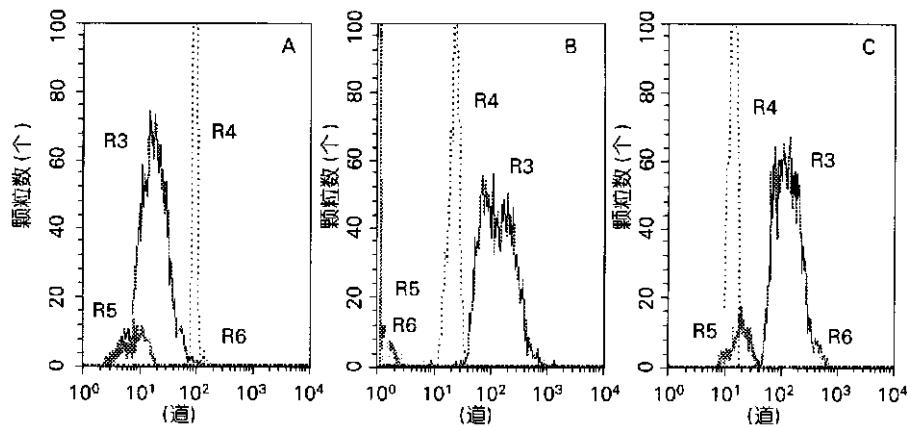


图4 各亚群的单参数直方图
FSC:颗粒的相对大小,FL2:橙荧光强度,FL3:红荧光强度
A. 4个亚群的 FSC单参数直方图;B. FL2单参数直方图;C. FL3单参数直方图
Fig.4 Monoparameter histogram of different subgroups

表1 E7站海水中各细胞亚群的流式细胞测量结果

Tab.1 Results of flow cytometry detection of cell subgroups

细胞亚群	FSC			FL2		FL3	
	范围 (道数)	几何平均值 (道数)	比值	几何平均值 (道数)	比值	几何平均值 (道数)	比值
R3	3~8	16.67	0.17	173.92	7.56	169.51	11.8
R5	2~25	7.61	0.08	1.20	0.05	21.52	1.50
R6	23~5425	193.65	1.98	1.66	0.07	1228.04	85.52
R4	49~193	97.75	1.00	23.01	1.00	14.36	1.00

表2 部分微型浮游植物的大小

Tab.2 Sizes of picoplankton

种群名称			粒径(μm)
<i>Prokaryotes</i>	<i>Cyanobacteria</i>	<i>Prochlorococcus</i>	0.6
		<i>Synechococcus</i>	0.8~1.5
<i>Eucaryotes</i>	<i>Chlorophyceae</i>	<i>Chlorella</i>	1.8~2.6
		<i>Nannochloris eukaryotum</i>	1.8~2.6
	<i>Prasinophyceae</i>	<i>Ostreococcus tauri</i>	0.8

横坐标上的相对位置可以判断它们的相对大小(FSC),细胞内的藻红素(FL2)和叶绿素(FL3)的相对含量。该站点4个细胞亚群的3个品行样品的3种参数的测量平均值列于表1。以标准微球的测量值为1.00,其他细胞亚群的测量值除以标准微球的测量值为细胞亚群对标准微球之比,可以用于不同样品间、不同实验室间的实验结果的比较。

3.5.1 各细胞亚群的大小 各细胞亚群的大小由回归直线方程 $Y=0.008X+0.2967$ 计算可得,其中X为测量到的FSC几何平均值(道),Y为细胞

直径的平方(μm^2)。R3的大小在0.56~0.96 μm ,平均为0.656 μm ,R5在0.55~0.67 μm ,平均为0.598 μm ,R6在0.69~6.6 μm ,平均为1.36 μm 。表2是法国罗斯考夫(Roscoff)海洋生物站提供的关于微型与微型浮游植物的部分名录^[7]。

将东黄海水站E7站35m处的各亚群的大小与表

2的资料相比较,R6细胞大小在Eucaryotes(真核浮游生物)范围内,R3和R4亚群细胞的大小与原核生物的Cyanobacteria(蓝细菌)相一致。单从细胞的大小还无法确定它们具体是什么种属。

3.5.2 各细胞亚群的荧光特性 由图6及表1的比值可见,R5和R6细胞亚群没有橙荧光,R3亚群的橙荧光大于Polysciences公司的1.002 μm 微球(R4内标微球);R6的红荧光远远大于R4,R3的红荧光略大于R4,R5的红荧光基本等于R4。

表3由西班牙巴塞罗那(Barcelona)海洋研究所生物

海洋实验室提供的关于微微型浮游植物流式细胞分析的部分结果^①。

综合东、黄海 E7 站样品中各亚群细胞的大小和荧光性质列表 4,与表 2 和表 3 的资料相比较,可以初步认为 R6 亚群为微型原核浮游生物 (Nanceu-karyotes); R3 为蓝细菌纲的聚球藻 (Cyanobacteria - 2 *Synechococcus*)。R5 为蓝细菌纲的原绿球藻 (Cyanobacteria-1 *Prochlorococcus*)。其中值得注意的是,这 3 个亚群的细胞大小范围与表 2 较一致, R3 的细胞小于 1 μm 而不是如表 3 中 Cyanobacteria-2 *Synechococcus* (聚球藻) 接近于 1 μm ; 3 个亚群的红荧光都大于表 3 中比较值,这是否因样品的不一致 (东黄海样品是现场测定样品,表 3 中的样品是戊二醛液氮固定样品),还是因为不同地区藻的差异,有待进一步研究。

4 结束语

流式细胞技术为我们提供了一种简单、快速分析浮游生物的实验方法。在测量时合理、灵活地使用光补偿参数,并以 Poliscience 荧光微球作为基准物,即可直接利用浮游生物的自发荧光进行微微型浮游生物亚群的辨别,并获得每一亚群的相对丰度。本研究较成功的完成了对微微型浮游植物的设定。在鉴定藻种时保持样品的新鲜度是实验成功的保证。由于流式细胞仪精确测量的这些参数值都是相对值,他们的数值大小在一定程度是专一的。测定结果在各种仪器信号的比较 (实际是样品之间的比较) 通常是通过样品值对参比的标准物所得信号进行参照而获得。仪器的

表 3 利用流式细胞分析技术确定浮游植物的种群

Tab.3 Phytoplankton types which can be analyzed by flow cytometry

种群名称	粒径(μm)	FL3	FL2
Cyanobacteria-1 <i>Prochlorococcus</i>	< 1	< beads	0
Cyanobacteria-2 <i>Synechococcus</i>	1	beads	> beads
"Picoeukaryotes" <i>Synechococcus</i> diatoms small flagellates	1	beads	0
Nanoekaryotes Diatoms flagellates	> 1	> beads	0
Cryptomonads	> 1	» beads	» beads

FL3:红荧光 (chlorophyll a, 叶绿素 a); FL2: 橙荧光 (phycobilines 藻红素) beads:Polysciences 公司 1 μm YG 黄绿微球。

表 4 E7 站海水各细胞亚群与内标微球相比较的流式资料

Tab.4 Camparation between cell subgroups and inner beads, which the information comes from results of flow cytometry detection

细胞亚群	大小(μm)	FL3	FL2
R5	< 1	~ beads	0
R3	< 1	> beads	> beads
R6	> 1	» beads	0

激光强度、光电倍增管 (PMT) 电压或线性放大器、光学过滤器、甚至不同的操作员,都会引起测量值的不一致。因此对细胞光学性质测定,除了计数之外,对每一群体有关细胞大小 (即从前向散射而得) 的信息和色素含量 (即从荧光强度求知) 都必须规范化。方法是每种有意义的参数的细胞信号被标准物信号除。这样才能进行不同样品甚至是不同实验室样品之间的比较,更有利于资源的共享。样品的保存和如何应用流式细胞技术进行多参数微微型浮游植物的研究有待进一步实验。

参考文献

- 1 焦念志,杨燕辉.四类海洋超微型浮游生物同步监测,海洋与湖沼,1999,30(5):506~511
- 2 Peeters J.C.H., G.B.J. Dubelaar, J. Ringelberg *et al.*. Optical Plankton Analyser: A Flow Cytometer for Plankton Analysis, I: Design Considerations, *Cyto metry*, 1989,10: 522~528
- 3 Yentsch C.M., P.K. Horan, K. Mirhead *et al.*. Flow cytometry and cell sorting: A powerful technique for analysis and sorting of aquatic particles, *Limnol Oceanogr*, 1983, 28: 1275~1280
- 4 Olson R.J., E.R. Zettler and O.K. Anderson. Discrimination of Eukaryotic Phytoplankton Cell Types From Light Scatter and Autofluorescence Properties Measured by Flow Cytometry, *Cyto metry*, 1989,10:636~643
- 5 Demers S., K. Davis, and T.L. Cucci. A Flow Cytometric Approach to Assessing the Environmental and Physiological Status of Phytoplankton, *Cyto metry*, 1989,10:644~652
- 6 Olson R.J., E.R. Zettler and M.D. DuRand. Handbook of methods in Aquatic microbial ecology. Boca Raton: Lewis Publishers, 1993. 175~186
- 7 Robinson J.p., Z. Darzynkiewicz, P.N. Dean *et al.*. *Current Protocols in Cyto metry*. New York: John Wiley & Sons Inc., 1999.

① Gasol J. M. . How to count picoplankton and bacteria with the FACScalibur flow cytometer Research Report, *Institut de Ciencies del Mar, CSIC*. Barcelona 1999.

研究报告 *REPORTS*

IDENTIFICATION OF MICROPHYTOPLANKTON POPULATIONS IN SEA WATER BY FLOW CYTOMETRY

ZHANG Li-hua ZHANG Jing CHAO Min

(*State Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research, East China Normal University, Shanghai, 200062*)

Received: Jun., 20, 2001

Key Words: Flow cytometry, Microphytoplankton, Autofluorescence

Abstract

This paper presents the preliminary results on the identification of microphytoplankton populations by means of flow cytometry (FCM). Samples from East China Sea were measured by FACS can FCM. The experimental results show that FACS can FCM can be used to distinguish various microphytoplankton species by measuring emission fluorescence from phytoplankton pigments when exposed to the argon laser with excitation wavelength of 488 nm. The optimization of experimental proceeding is undertaken to study the distribution and abundance of phytoplankton in coastal waters.

(本文编辑:张培新)