

流式细胞仪在海洋生物学研究中的应用

Applications of flow cytometry (FCM) in researches of marine biology

刘 昕, 张俊彬, 黄良民

(中国科学院 南海海洋研究所, 广东 广州 510301)

中图分类号: Q958.8; Q959.483

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096 (2007) 01-0092-05

流式细胞仪 (flow cytometry, 简称 FCM) 是一项集激光技术、电子物理技术、光电测量技术、计算机技术以及细胞荧光技术等为一体的仪器。研究对象为单细胞和其它生物颗粒。流式细胞仪主要由流动室和液流系统、激光源和光学系统、检测系统和分析系统四大部分组成。流式细胞仪的工作原理是: 将特异性荧光染料染色的颗粒在气压和鞘液的约束下形成单细胞 (颗粒) 柱, 后者与入射的激光束垂直相交, 液柱中的细胞 (颗粒) 被一定波长的激光激发产生荧光, 特征荧光的散射和吸收等信号被光学系统 (透镜、光阑、滤片等) 收集, 并被检测系统和分析系统储存, 从而进行分析判断^[1]。有的流式细胞仪还具备细胞分选功能, 由喷嘴射出的液柱被分割成一连串的小水滴, 根据选定的特定参数依靠逻辑电路判别细胞是否将被分选, 而后由充电电路对选定细胞液滴充电, 带电液滴携带细胞通过静电场而发生偏转, 从而完成细胞 (颗粒) 分选^[2]。

流式细胞仪自 20 世纪 70 年代初发明后, 起初主要应用于免疫学、血液学、肿瘤学、细胞生物学、细胞遗传学、生物化学等临床医学和基础医学的研究。20 世纪 80 年代末, 随着海洋科学的发展, 流式细胞仪开始进入海洋生物学的研究范畴, 应用于海洋浮游植物和海洋细菌的分类鉴定计数和生理生化研究以及海洋经济物种遗传育种等方面, 极大推动了海洋生态学和海洋实验生物学的发展。

1 流式细胞仪在海洋浮游植物研究中的应用

浮游植物 (phytoplankton) 是海洋生态系统中的

初级生产者, 是整个海洋生态系统存在和维系的基础。浮游植物根据其粒径大小可分为小型浮游植物 (microphytoplankton, 大于 20 μm), 微型浮游植物 (nanophytoplankton, 介于 2 μm 和 20 μm 之间) 和超微型浮游植物 (picophytoplankton, 小于 2 μm) 三类^[3]。传统的光学显微镜技术是浮游植物种类鉴定的重要手段, 至今仍是浮游生物学家进行研究观测的必备工具, 不过对于个体较小的微型藻类及超微型藻类的形态学观察, 常规光学显微镜则存在困难。而且, 当研究涉及时间、空间尺度较大时, 牵涉到的工作量非常大, 光学显微镜方法在物种计数的速度与准确性方面受到很大限制^[3-5]。流式细胞仪最早应用于浮游植物的研究始于 20 世纪 80 年代末, Yentsch 等^[6,7]有关海洋中生物微粒粒径的划分和分析方法的叙述, 对流式细胞仪应用于海洋微型浮游植物研究起了积极的推动作用。在常规显微技术难以观察的微型及超微型浮游植物类群的分析检测方面逐渐占有了一席之地。

海洋浮游植物的种类繁多, 从自然水体中获得的样品往往包含数十种到数百种之多, 而且有的浮游植物在形态特性上还存在亚种间的差异, 要全面了解浮游植物的生理生态情况, 如果仅仅依靠传统方法进行

收稿日期: 2005-12-21; 修回日期: 2006-08-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (40306022); 广东省自然科学基金资助项目 (04001300)

作者简介: 刘昕 (1981-), 女, 湖北武汉人, 硕士研究生, 从事海洋生物学研究; 张俊彬, 通讯作者, 电话: 020-89023219,

E-mail: jbzhang30@vip.sina.com

种类分类和计数需要投入大量人力和资金,并且主观性较大。而这恰恰是流式细胞仪最大的优势,流式细胞仪可以对单细胞浮游植物进行同步、迅速并且多参数的分析。它可以根据微粒的荧光特性反映出浮游藻类的大小、形状、结构或者是色素类型,从而对浮游植物进行定量和定性研究。改进型的流式细胞仪还可以对单个浮游植物细胞进行分选,从而方便不同种浮游植物的分离以便进一步富集培养。这种准确的细胞水平的鉴别在研究浮游植物时是必不可少的,正因为如此,流式细胞仪被海洋生物学家广泛地用于进行浮游植物的种类和数量分布的研究^[8-10]。Shalapyonok等^[11]和Tanrran等^[12]利用显微镜和流式细胞仪相结合的方法分别测定了阿拉伯海多个站点在1994年和1995年季风期间的浮游植物的生物量和群落结构,分析了季风期间水流对浮游植物分布的影响。Garrison等^[13]则利用流式细胞仪研究了阿拉伯海微生物食物网结构,并分析了海区不同深度浮游植物的能量收支和动态变化,发现在混合层,原核生物原绿球藻(*Prochlorococcus marinus*)、聚球藻(*Synechococcus* spp.)以及绝大部分超微真核生物的个体密度呈现明显的昼夜变化节律,个体密度在中午或黄昏最小,在午夜最大,昼夜变幅大于40%,而且超微型藻类的生长量和被摄食量在一昼夜的时间尺度上接近平衡。DuRand等^[14]利用流式细胞仪调查了百慕大大西洋的浮游藻类的群落结构,分析了浮游植物的季节变化规律,结果表明:聚球藻以及真核浮游植物在春季的时候浓度最高,且在表层浓度达到最高值;而原绿球藻在夏季和秋季的时候浓度最高,在次表层其浓度达到最高值。此外,流式细胞仪可以应用于海洋污染的监测,我们可以根据污染物对浮游藻类的生理和生长活动的影响来判断水体的污染程度,从而达到检测海水污染的目的。Stauber等^[15]指出,在环境检测方面,流式细胞仪测定比传统方法存在很多优势,它不需要细胞培养,以及富集在自然环境条件下并不存在的细胞浓度,并可以在海水中直接测定。而且流式细胞仪可以准确地分辨出活细胞、死细胞以及干扰的颗粒状物质,这样就能更好地应用于监测海水污染情况。

2 流式细胞仪在海洋细菌研究中的应用

近年来,海洋细菌已经成为海洋学的研究的热点^[16-18]。这是由于海洋细菌在海洋中分布广泛、密度高($10^5 \sim 10^6$ 个/cm³),而且忍受极端环境的能力

非常强,更重要的是,海洋细菌有多种多样的代谢途径和强大的代谢功能。在海洋环境中,细菌在物质循环和能量循环中扮演着重要角色,它能分解海水中的有机质并将营养物质提供给上一级浮游植物,从而完成物质循环^[19],是海洋生物链中不可或缺的重要组成部分。海洋细菌在海洋生态中的作用以及在极端环境中特殊功能的研究愈来愈引起海洋学家的关注。

海洋环境中的细菌的研究首先要对细菌的形态特性和生理参数测定,过去传统的细菌鉴定方法主要依赖于实验室培养,然后利用其生化特性结合显微镜染色观察的方法进行鉴定^[20]。与浮游植物相比,海洋细菌的个体更小,核内的DNA、RNA和蛋白质的含量低,染料着色比较困难,而且与光合原核生物原绿球藻、蓝细菌相比,异养细菌不包含任何色素,不能由自发荧光来加以区别,另外因为海洋细菌的体积太小,很多海洋细菌的检测信号很弱,但流式细胞仪的专用染料的不间断推新逐步弥补了这一缺憾,新型染料的信噪比已大大加强,SYBR系列染料被证明适合于海水样品的细菌计数^[21]。流式细胞仪简便快捷,并具备多参数测定的优点并能兼容其他分子生物学测定手段的特性,在实验室和现场测定都能起到很好的效果,所以,流式细胞仪开展海洋细菌的相关研究成为国际上的研究趋势^[22]。Legendre^[23]统计了1989~1999年间流式细胞仪在海洋研究方面的文献,绝大部分的相关研究集中在浮游植物和海洋细菌两个方面,其中,77%的工作是关于浮游植物的,21%是关于海洋细菌的。

流式细胞仪在海洋细菌相关研究中的应用主要表现在以下几个方面:(1)海洋细菌的计数以及生物量统计;(2)海洋细菌生理生化分析,如细菌的活性或细胞膜的完整性以及代谢物质的测定;(3)与分子生物学相结合,进行海洋细菌的种类鉴定。与分子生物学和细胞生物学的结合已成为流式细胞仪发展的方向,例如,采用流式细胞仪与荧光原位杂交技术(FISH)及变性梯度凝胶电泳(DGGE)结合的方法来研究浮游细菌的分类鉴定^[24]。在墨西哥北部湾的浮游细菌种类调查的项目中,Jochem等将荧光原位杂交技术和流式细胞仪技术相结合,从而准确鉴定出海洋细菌的种类,并对细菌生物量进行了统计,分析了墨西哥北部湾海域浮游细菌的时空变化^[25]。Karina利用流式细胞仪调查了百慕大大西洋不同季节的浮游植物和细菌的生物量,得出一年中不同季节

中浮游植物和细菌的水平变化和垂直变化规律^[26]。Magarnos 在基于细菌细胞膜完整性的条件下,利用流式细胞仪进行细菌的活体检测,研究了在贫营养条件下杀鱼巴斯德氏菌 (*Pasteurella piscicida*) 在海水中的分布状况与生态环境因子之间的关系^[27]。Grégori 在实验室条件下模拟了不同温度条件下异养细菌的增殖能力,并利用流式细胞仪分析了法国马赛湾异养细菌的季节变化情况^[8]。

3 流式细胞仪在海洋经济动物细胞核研究中的应用

细胞核 DNA 含量的变化体现细胞的生命历程,也是生物的重要生化特征。在海洋生物范畴内开展这方面的相关工作对推动海洋生物细胞学的基础研究以及经济动物的遗传育种均具有十分重要的意义。

由于流式细胞仪能对单个细胞或细胞器的 DNA 含量进行快速测量,现已成为染色体倍形检测以及分析细胞凋亡的重要手段。在整个细胞周期, G₁ 期和 G₂/M 期的细胞含有稳定的 DNA 含量,分别命名为 1C 和 2C (2N 和 4N),而 S 期的 DNA 含量介于 1C 和 2C 之间。应用流式细胞仪测定细胞 DNA 的含量变化,可以确定细胞的分裂时期^[28]。传统的倍性检测主要采用染色体计数方法,虽然其具有误差小、可信度高的特点,但是这种方法比较费时,而且不能进行活体检测。流式细胞仪的应用可以弥补这些缺陷,其最大的优点是能快速地分析大量样品,及时得到倍性检测结果。吴洪喜等利用流式细胞仪分析泥蚶 (*Tegillarca granosa*) 血细胞不同时期的 DNA 含量变化,结果表明,在所有的组方图中只有一个峰(G₀/G₁),表明了泥蚶血液不存在合成期(S)、合成后期(G₂)和分裂期(M)细胞,血细胞已失去分裂功能,不存在周期现象^[29]。周岭华等^[30]利用流式细胞仪测定中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*)、日本对虾 (*Penaeus japonicus*) 和刀额新对虾 (*Metapenaeus ensis*) 倍性的结果。丁君等^[31]利用流式细胞仪检测了进行了多倍体诱导的贝类的诱导结果。

细胞一经固定就不再是活细胞,而且细胞固定过程对细胞膜的通透性也有影响。因此发展了用“细胞活性”鉴定染料染色的流式细胞仪检测方法。流式细胞仪通常根据细胞膜完整性将细胞分为“活细胞”和“死细胞”,正常细胞和凋亡细胞归为活细胞。活

细胞染料如 Hoechst33342 能少许进入活细胞膜而对细胞没有太大的细胞毒作用。Hoechst33342 在凋亡细胞中的荧光强度要比正常细胞中高,而 EB、PI 或 7-AAD 等染料是不能进入活细胞中,即正常细胞和凋亡细胞在不经固定的情况下对这些染料是拒染。根据这些特性,用 Hoechst33342 活细胞染料结合 PI 或 EB 等染料对凋亡细胞进行双染色,就可在流式细胞仪上将正常细胞、凋亡细胞和坏死细胞区别开来。Sokolova 等用流式细胞仪检测了环境中的镉离子对牡蛎的血细胞产生的影响,发现 10 ~ 100 μmol/L 镉离子能引发牡蛎血细胞的凋亡,并进一步证实了在凋亡过程中发生的 ATP 产率下降是由于 Fe/F₁-ATPase 和线粒体 ADP/ATP 或者底物的转运受到抑制造成的^[32]。

4 流式细胞仪在海洋生物研究中的进展和应用前景

4.1 数据处理上的进展

流式细胞仪已经在海洋生物研究中得到广泛的应用。但是由于流式细胞仪在海洋生物研究中尚处于起步阶段,因此还存在诸多技术上的限制与不足。如流式细胞仪的数据分析软件 CellquestTM(for Macintosh 系统)针对单个或数个数据文件进行分析,但海洋生物调查往往采集大量样品,测量量很大,应用流式细胞仪进行分析时往往会产生几百个数据文件,如果不掌握一定技巧,很难快速、准确地分析数据文件。由于流式细胞仪的数据分析软件是基于医学研究而开发的,因此在海洋生物学的专用软件的研发就显得尤为迫切,值得可喜的是,这方面的研究已经取得了进展。晁敏等^[33]总结了一套快速分析数据方法,使结果按设定的参数、时间顺序、采样深度排列并自动输出,从而在短时间内完成数据分析。Aminis 公司新推出的图像流式细胞仪所配备的 IDEAS 分析软件包能够提供功能强大灵活易接近的数据分析。IDEAS 软件包能分析每个细胞超过 200 个数目的特征,包括多形态测量和荧光强度测量,它们能用于定义和描述细胞群特征。

4.2 仪器设计和应用上的进展

随着微电子技术特别是计算机技术的发展,计算能力不断提高,流式细胞仪的功能也越来越强大,在数据管理、数据分析方面有了长足的进步。与此同时,在流式细胞仪的设计和应用方面也开始产生突破性

的进展。传统的流式细胞仪体积较大,在海洋现场调查的实际应用方面存在着一定的困难。针对这一问题,Olson 等^[16]首次报道了用改装的流式细胞仪在海上直接测定浮游植物群落组成的方法,此后这种技术发展迅速,并诞生了小型船用流式细胞仪,这些新型的流式细胞仪可以方便地进行海洋生物的调查工作。BD 公司研制的 FACSScount 型便携式流式细胞仪仪器小巧,携带方便,操作简单,特别适用于携带上船进行海洋考查。除此之外,研究者还可以根据需要测定的海洋生物具体特性的不同,设计出专门用途的流式细胞仪,从而可以在更广阔的领域得到应用。

4.3 在海洋生物研究中的应用前景

流式细胞术是一个分析染色体、细胞核和细胞等颗粒的有用手段,在人类基因组计划中发挥了重要作用,一些技术如流式核型分析,分拣纯化染色体,定位基因,构建文库等会成为海洋生物基因组研究的重要手段。此外,以 X 精子和 Y 精子的 DNA 含量差别为基础的流式细胞仪分离精子技术是有效的用于哺乳动物性别控制方法^[34],也将会应用到海洋生物生殖与遗传研究中。在海洋微型生物方面,传统的流式细胞技术和先进的成像技术结合诞生的图像流式细胞仪其图像处理能力可与荧光显微镜相比,其发展和运用必然极大地推动海洋微生物亚细胞水平的研究,新的种类的发现等。

参考文献:

[1] 何克健. 流式细胞技术与流式细胞仪[J]. 医疗装备, 2000, 5:6-8.

[2] 宁修仁. 流式细胞测定技术在海洋生物和海洋生态环境监测研究中的应用[J]. 东海海洋, 2001,3:56-60.

[3] 晁敏, 张利华, 张经. 海洋微小型浮游植物的流式细胞计数数据分析[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2003, 3:105-108.

[4] 晁敏, 张利华, 张经. 流式细胞计在海洋浮游植物研究中的应用[J]. 海洋科学, 2003,27(4):18-22.

[5] 张利华. 流式细胞术在海洋浮游植物研究中的应用[J]. 东海海洋, 1998,16(1):59-62.

[6] Yentsch C M, Horan P K. Cytometry in aquatic sciences[J]. **Cytometry**, 1989,10(5):1 250-1 255.

[7] Yentsch C M, Horan P K, Muirhead K, *et al.* Flowcytometry and cell sorting : a technique for analysis and sorting of aquatic particles[J]. **Limnol Oceanogr**, 1983,28(6):1 275-

1 280.

[8] Lollier J L. Flow cytometry and the single cell in Phycology [J]. **J Phycol**, 2000,36(8):628.

[9] 陈敏艺,袁洁,陈月琴,等. 海洋超微型浮游植物遗传多样性的分子系统学研究进展[J]. 自然科学进展, 2005,15(9): 1 032-1 041.

[10] 孙书存,陆健健,张利华.流式细胞仪在微型浮游植物生态学中的应用[J]. 生态学杂志, 2000,19(1):72-78.

[11] Shalapyonok A, Olson R J, Shalapyonok L S. Arabian Sea phytoplankton during Southwest and Northeast monsoons 1995: composition, size structure and biomass from individual cell properties measured by flow cytometry[J]. **Deep-Sea Res Pt II**, 2001,48:1 231-1 261.

[12] Tarran G A, Burkill P H, Edwards E S, *et al.* Phytoplankton community structure in the Arabian Sea during and after the SW monsoon, 1994[J]. **Deep-Sea Res Pt II**, 1999,46: 655-676.

[13] Garrison D L, Gowing M M, Hughes M P, *et al.* Microbial food web structure in the Arabian sea: a US JGOFS study[J]. **Deep-Sea Res Pt II**, 2000,47(7-8):1 387-1 422.

[14] DuRand M D, Olson R J, Chisholm S W. Phytoplankton population dynamics at the Bermuda Atlantic Time-series station in the Sargasso Sea[J]. **Deep-Sea Res Pt II**, 2001,48:1 983-2 003.

[15] Stauber J L, Franklin N M, Adams M S. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae[J]. **Trends Biotechnol**, 2002, 20 (4): 141-143.

[16] Olson R J, Vault D, Chisholm S W. Marine phytoplankton distributions measured using shipboard flow cytometry[J]. **Deep-Sea Res Pt II**, 1985,32:1 273-1 280.

[17] Olson R J, Shalapyonok A, Sosik H M. An automated submersible flow cytometer for analyzing pico- and nanophytoplankton: Flow Cytobot[J]. **Deep-Sea Res Pt I**, 2003,50: 301-315.

[18] Grégori G, Citterio S, Ghiani A, *et al.* Resolution of viable and membrane-compromised bacteria in freshwater and marine waters based on analytical flow cytometry and nucleic acid double staining[J]. **Appl Environ Microb**, 2001,67(10): 4 662-4 670.

[19] Porter J, Deere D, Pickup R, *et al.* Fluorescent probes and flow cytometry: new insights into environmental bacteriology[J]. **Cytometry**, 1998,23(2):91-96.

- [20] Veal D A, Deere D, Ferrari B, *et al.* Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells[J]. **J Immunol Methods**, 2000, **243**(20): 191-210.
- [21] 郭沛涌, 沈焕庭, 张利华. 流式细胞术在水体微型生物分子生物学研究中的应用 [J]. 生命的化学, 2001, **21**(6):520-522.
- [22] Gruden C, Skerlos S, Adriaens P. Flow cytometry for microbial sensing in environmental sustainability applications: current status and future prospects[J]. **Microbial Ecol**, 2004, **49**:37-49.
- [23] Legendre L, Courties C, Troussellier M. Flow cytometry in oceanography 1989-1999: environmental challenges and research trends[J]. **Cytometry**, 2001, **44** (3):164-172.
- [24] Fuchs B M., Zubkov M V, Sahm K, *et al.* Changes in community composition during dilution cultures of marine bacterioplankton as assessed by flow cytometric and molecular biological techniques[J]. **Environ Microbiol**, 2000, **2**(2):191-201.
- [25] Jochem F J. Morphology and DNA content of bacterio-plankton in the northern Gulf of Mexico: analysis by epifluorescence microscopy and flow cytometry[J]. **Aquat Microb Ecol**, 2001, **25**: 179-194.
- [26] Karina Y G, Sallie W C, Robert J O. Seasonal and depth variation in microbial size spectra at the Bermuda Atlantic time series station[J]. **Deep-Sea Res Pt I**, 1999, **46**: 1 221-1 245.
- [27] Magarinos B, Romalde J L, Cid A, *et al.* Viability of starved *Pasteurella piscicida* in seawater monitored by flow cytometry and the effect of antibiotics on its resuscitation[J]. **Lett Appl Microbiol**, 1997, **24**(2):122-126.
- [28] 丁君, 常亚青, 邢荣莲, 等. 九孔鲍不同器官 DNA 相对含量与细胞周期的分析[J]. 大连水产学院学报, 2003, **18**(9): 200-203.
- [29] 吴洪喜, 柴雪良, 吴建波, 等. 乐清湾泥蚶血细胞周期和 DNA 含量[J]. 海洋科学, 2002, **26**(3):47-49.
- [30] 周岭华, 邓田, 张晓军, 等. 利用流式细胞计进行虾类倍性检测的研究[J]. 海洋科学, 1999, **2**:42-45.
- [31] 丁君, 张国范, 常亚青, 等. 流式细胞术(FCM)在贝类倍性检测中的应用 [J]. 大连水产学院学报, 2000, **15**(4):259-263.
- [32] Sokolova I, Evans S, Hughes E. Cadmium induced apoptosis in oyster hemocytes involves disturbance of cellular energy balance but no mitochondrial permeability transition[J]. **J Exp Biol**, 2004, **207**: 3 369-3 380.
- [33] 晁敏, 张利华, 张经. 海洋微小型浮游植物的流式细胞计数据分析[J]. 华东师范大学学报, 2003, **3**:105-108.
- [34] 陆阳清, 张明, 卢克焕. 流式细胞仪分离精子法的研究进展 [J]. 生物技术通报, 2005, **3**:26-30.

(本文编辑 : 刘珊珊)