

文章编号: 1000-0615(2008)02-0200-09

三类分子探针对常见赤潮生物的检测

侯建军^{1,2,3}, 赖红艳^{1,3}, 雷红灵³, 黄邦钦²

(1. 华中农业大学水产学院, 湖北 武汉 430070;

2. 厦门大学近海海洋环境科学国家重点实验室, 福建 厦门 361005;

3. 湖北民族学院湖北省生物资源保护与利用重点实验室, 湖北 恩施 445000)

摘要:集中使用寡核苷酸、肽核酸和细胞凝集素 3 类探针对来自东海和厦门海域的现场赤潮样品进行了检测, 尝试鉴定识别自然水样中有害的赤潮原因种塔玛亚历山大藻, 微小原甲藻和纤小裸甲藻, 建立和优化了这些探针的检测方法和样品处理程序。结果表明, 在东海和厦门海域的赤潮样品中均成功地检出了塔玛亚历山大藻的分布情况, 各探针的检测效率为 DBA > Tama28S > Tama5S; 在东海和厦门海域的赤潮样品中, 也成功地检测出了微小原甲藻, 各探针的检测效率为: ConA > PM18S02 > PM28S02; 在厦门海域的赤潮水样中检出了纤小裸甲藻, 各探针的检测效率为: WGA > PNATP28S01 > TP18S02 > TP28S01。各探针检测结果与相关文献的报道吻合较好。比较这 3 类探针的特异性, 其中以 PNA 探针为最好, 其次为 DNA; lectin 探针的特异性相对较弱。

关键词:赤潮; 寡核苷酸; 肽核酸; 细胞凝集素; 探针

中图分类号: X 835

文献标识码: A

形成赤潮的生物种类具有短期快速增殖的能力, 能够很快地由很少的数量增长到赤潮水平; 低细胞丰度、复杂的群落结构和共存的其它物种以及它们的生理代谢物对常规监测产生很大的影响^[1]; 赤潮生物鉴定的不准确或鉴定错误将对赤潮的防治和早期评估带来很大的困难。良好的检测方法要求仅通过简单的培训就能为环境监测机构或志愿者等非专业人员所应用。基于分子基础(核酸、蛋白、糖蛋白)的检测方法较传统检测方法有很大的优势, 种类鉴定更为准确可靠, 并能够提供定量信息, 可以检测较低丰度的目标赤潮藻种^[2]。目前有 3 类探针可应用于对现场赤潮生物进行监测和鉴定, 它们是基于核酸序列分析而设计的寡核苷酸探针^[3-5], 肽核酸(PNA)探针^[6-8]

和基于细胞表面特异性糖基的进行标记识别的糖蛋白探针细胞凝集素(lectin)^[9-11]。这些探针各有其优缺点, 如何把这些探针同时集合起来对某一海域的赤潮样品进行检测的应用研究国内外均未见报道。东海和福建沿海是中国赤潮的多发海域。随着经济的高速发展, 尤其是海水养殖业的快速发展, 中国东南沿海富营养化程度日益加剧, 造成这些海域不断地发生赤潮灾害^[12-13]。用分子探针开展这些海域的常规赤潮监测十分必要。

1 材料与方 法

1.1 现场采样测站选择及样品采集方法

根据东海、福建沿海及厦门海域历次赤潮发生的特点及时间, 有针对性地选择相关地点和测

收稿日期: 2007-05-17

资助项目: 国家“九七三”重点基础研究发展规划(CEOHAB2001CB409704); 中国博士后基金(20060400854); 农业部淡水鱼类种质资源与生物技术重点实验室开放课题(LFB20070611); 厦门市创新科技基金(3502Z20041059); 教育部博士点基金(20070504076)

作者简介: 侯建军(1966-), 男, 湖北恩施人, 教授, 博士, 主要从事环境科学和分子生态学研究。Tel: 027-63995489, E-mail: jjhou@mail.hzau.edu.cn

通讯作者: 黄邦钦, Tel: 0592-2182216, E-mail: bqhuang@xmu.edu.cn

站,结合 973 赤潮项目的航次计划(图 1-A)及厦门海洋环境监测中心站的监测监视采样计划(图 1-B),安排样品的采集和收集。同时也根据这些海域赤潮发生的客观情况,实时安排样品的采集。用采水器采集 5~10 L 海水,用 10 μm 筛绢过滤浓缩,将样品水体积缩小为 100~200 mL,测量体积,根据样品研究的需要加入 1/10 体积的多聚甲醛(10%)或鲁格氏碘液,终浓度 1%,并加入 500~1000 μL 天净沙 RNAin™(用于保护 RNA,避免

其降解),镜检计数,置 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存,标签纸上注明采水体积,测站和采样日期及时间,尽快进行样品的分析处理。

1.2 探针的选择

寡核苷酸探针由商业公司(上海生工)合成(表 1),PNA 探针委托成都派德生物技术有限公司合成,Lectin 探针均购自 Vector Laboratories Inc (Burlingame, CA, FLK-2100; FLK-3100)。全部探针均采用异硫氰酸荧光素(FITC)标记。

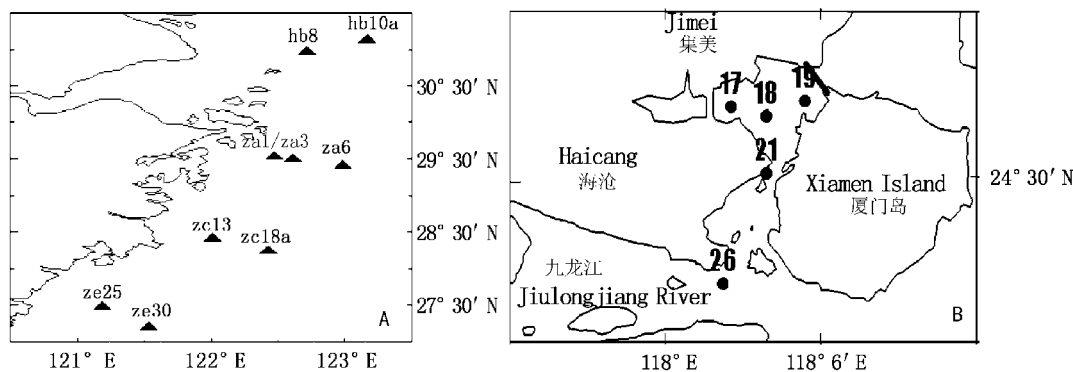


图 1 采样测站设置

Fig.1 Map of sampling stations

A 为长江口及邻近的采样测站;B 为厦门西海域采样测站。其中,B 的 17 号为 Fjchch021 测站;18: Fjchch023;19: Fjchch022;21: Fjchch024。

A, Sampling stations of the Yangtze River Estuary and adjacent the East China Sea;B, Sampling stations of the western Xiamen Bay. In B, 17: Fjchch021 station, 18: Fjchch023; 19: Fjchch022; 21: Fjchch024

表 1 探针种类

Tab.1 Probes used in this study

| 探针 probes | 来源或位置 sources or location in rDNA | 序列或特异性 sequences or specificity(5'→3') |
|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------|
| Tama28S(寡核苷酸探针) | 塔玛亚力山大藻(28S rDNA) | GCAAGTGAACACTCCCACC ^[4] |
| Tama5S(寡核苷酸探针) | 塔玛亚力山大藻(5.8S rDNA) | TATCCCAAAGGCACAAGTAA ^[4] |
| PM18S02(寡核苷酸探针) | 微小原甲藻(18S rDNA) | TTTATGACCTTGCCCTGGAAA |
| PM28S02(寡核苷酸探针) | 微小原甲藻(28S rDNA) | CATTCTGGAAGCTCGTCT |
| TP18S02(寡核苷酸探针) | 纤小裸甲藻(18S rDNA) | CAGGCCGAGCCAGATACGCA |
| TP28S01(寡核苷酸探针) | 纤小裸甲藻(28S rDNA) | CGATGCCATCTCAAGACT |
| PNATP28S01(肽核酸探针) | 纤小裸甲藻(28S rDNA) | ATGCCATCTCAAGA |
| ConA(细胞凝集素探针) ^[11] | 刀豆凝集素 | 甲基 α - 甘露糖胺; D-甘露糖; D-葡萄糖 |
| DBA(细胞凝集素探针) ^[11] | <i>Dolichos biflorus</i> | N-乙酰-D-氨基半乳糖 |
| WGA(细胞凝集素探针) ^[11] | 麦胚凝集素(wheat germ) | N-乙酰氨基葡萄糖 |

1.3 全细胞荧光杂交结合特异性寡核苷酸探针检测方法 将现场样品进行浓缩及显微镜计数后,对藻的自发荧光进行脱色:采用乙醇、丙酮或者甲醇梯度脱色(脱色效果和时间依具体情况

而定),过滤。用针筒吸取 1~2 mL 左右浓缩脱色后的样品,在 13 mm 针筒过滤器上低压过滤,细胞则留在聚碳酸酯膜或核孔膜上。全细胞杂交参考文献[5,14-16]的方法。

1.4 细胞凝集素探针检测方法

荧光标记的 lectin ($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 以人工海水配置。样品的固定及显微镜计数, 浓缩, 脱色, 洗涤, 步骤同 1.3。然后将膜置于玻片上, 加入 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 lectin 探针 $50 \mu\text{L}$, 在 $20 \text{ }^\circ\text{C}$ 暗反应处理 $45 \sim 60 \text{ min}$ 。反应结束后, 以过滤无菌的人工海水离心洗涤 $2 \sim 3$ 次, 滤掉, 洗涤后用干净滤纸吸干滤膜。加入 $10 \sim 60 \mu\text{L}$ Citifluor/DAPI - Mix (含 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DAPI) 复染并防止荧光衰退^[11]。所有的检测均采用“盲测法”^[17]。

1.5 原位荧光杂交结合特异性 PNA 探针检测方法

现场样品杂交前的处理步骤同上。杂交操作根据文献报道的方法改进^[6-7]。将处理的滤膜置于玻片上, 用针筒吸取预热的杂交缓冲溶液 [$25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 9.0; $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl; 0.5% (w/v) SDS] 1 mL 清洗一次, 5 min , 过滤掉, 然后直接加入预热的杂交缓冲液 $100 \mu\text{L}$ 与荧光探针, 使探针终浓度达到 $300 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将玻片置于温湿杂交盒(自制)于暗处 $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 杂交 30 min 。温湿暗杂交盒中的湿纸用杂交缓冲液润湿, 并确保含探针的杂交缓冲液完全覆盖滤膜。用预热 ($55 \text{ }^\circ\text{C}$) 的杂交清洗液 ($10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, pH 9.0, $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA) 洗涤滤膜来终止杂交反应, $100 \mu\text{L}$ 清洗 3 次, 每次温育 5 min , 洗涤后用干净

滤纸吸干滤膜, 然后再加入 $10 \sim 60 \mu\text{L}$ Citifluor/DAPI-Mix (含 $1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ DAPI) 复染以防止荧光衰减^[11,18]。

2 结果及分析

2.1 东海和厦门海域现场赤潮样品中塔玛亚历山大藻的检测结果

在东海和厦门海域的相应测站都出现了塔玛亚历山大藻, 并形成了一定的密度。东海在 2005 年 5 月 9 日的 hb8 和 hb10a 测站均出现了较高的塔玛亚历山大藻密度; 2005 年 3 月 25 日在 ze25 号测站的塔玛亚历山大藻密度最低, 寡核苷酸探针 Tama5S 在该测站未能检出塔玛亚历山大藻的存在。2005 年 7 月 3 日和 7 月 5 日, 在厦门海域 Fjchch022 和 Fjchch024 均出现了塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*), 其余测站则相对较少或未能检出。对两类探针的检测结果进行比较分析, 发现 DBA 的阳性检出率大大高于寡核苷酸探针的阳性率, 两类探针和显微镜下的明视野计数有较大的差异。在寡核苷酸探针中 Tama28S 的检出数量要高于 Tama5S, 提示探针 Tama5S 不适合用于对现场样品进行检测。上述检测手段的检测结果排序为: brightfield > DBA > Tama28S > Tama5S(表 2)。

表 2 不同探针对 2005 年东海及厦门西海域赤潮样品中的塔玛亚历山大藻检出数量和测站分布

Tab.2 Cell number and its distribution of *Alexandrium tamarense* in the East China Sea and Western Xiamen Bay estimated by different probes in 2005 cell · L⁻¹

| 采样时间及测站 sampling time and stations | DBA | Tama28S | Tama5S | 明视野 bright field |
|---------------------------------------|------------------|-----------------|----------------|---------------------|
| 2005-04-29/Fjchch022 | 1202.67 ± 84.57 | 38.33 ± 6.11 | 14.33 ± 3.51 | 1670 |
| 2005-07-03/Fjchch022 | 6122.33 ± 164.17 | 166.33 ± 24.03 | 65.33 ± 10.07 | 6670 |
| 2005-07-05/Fjchch022 | 6098.00 ± 167.23 | 258.33 ± 31.01 | 140.67 ± 15.57 | 6670 |
| 2005-07-05/Fjchch024 | 3013.00 ± 131.73 | 35.33 ± 12.10 | 14.00 ± 4.58 | 3330 |
| 2005-05-03/ze25 | 415.33 ± 11.24 | 2.67 ± 2.35 | 0 | 534.67 ± 38.37 |
| 2005-05-03/ze30 | 1001.00 ± 92.71 | 40.33 ± 6.66 | 16.67 ± 5.69 | 1226.00 ± 60.90 |
| 2005-05-04/zc13 | 406.67 ± 56.41 | 21.33 ± 5.57 | 13.00 ± 3.61 | 654.67 ± 41.50 |
| 2005-05-04/zc18a | 8111.67 ± 100.75 | 346.33 ± 46.61 | 204.00 ± 50.27 | 10028.67 ± 172.15 |
| 2005-05-07/za1 | 2615.67 ± 83.44 | 71.33 ± 27.01 | 34.33 ± 10.02 | 3214.33 ± 89.05 |
| 2005-05-07/za3 | 4150.00 ± 106.07 | 142.00 ± 22.72 | 36.33 ± 6.66 | 5153.33 ± 153.43 |
| 2005-05-07/za6 | 1112.67 ± 75.34 | 41.67 ± 21.73 | 18.67 ± 2.52 | 1265.00 ± 60.56 |
| 2005-05-09/hb10a | 9695.00 ± 564.01 | 417.33 ± 106.93 | 272.00 ± 22.11 | 11332.00 ± 227.51 |
| 2005-05-09/hb8 | 9464.00 ± 440.44 | 539.67 ± 120.23 | 223.00 ± 77.16 | 11152.33 ± 180.81 |

注: 采样测站及名称详见图 1

Notes: Sampling stations and its name are provided in Fig. 1

2.2 厦门海域现场赤潮水样中纤小裸甲藻的检测结果 在供试的 9 个样品中,2005 年 7 月 5 日在厦门西海域的 Fjchch023 测站出现了最高密度的纤小裸甲藻 (*Takayama pulchellum*),但没有接近赤潮水平(表 3)。其次是在 2005 年 7 月 4 日的 Fjchch024 测站;2005 年 8 月 24 日的 Fjchch021 测站该藻密度相对较低。表明厦门西海域在 2005 年频繁地出现了纤小裸甲藻,但未达到赤潮水平。

提示纤小裸甲藻是厦门西海域常见的赤潮生物。3 类探针的检测数量有一定差异。其中 PNATP28S01 检测的阳性率要显著高于同序列寡核苷酸探针 TP28S01 的检出率 ($P < 0.01$),也高于能产生最佳杂交检测效果的寡核苷酸探针 (TP18S02) 的检出率。不同探针的检测结果排序为: brightfield > WGA > PNATP28S01 > TP18S02 > TP28S01。

表 3 不同探针对 2005 年厦门西海域赤潮样品中纤小裸甲藻检出数量和测站分布

Tab.3 Cell number and its distribution of *Takayama pulchellum* in Western Xiamen Bay estimated by different probes in 2005

| 采样时间及测站 sampling time and stations | WGA | TP18S02 | TP28S01 | PNATP28S01 | 明视野 bright field |
|---------------------------------------|-------------------|------------------|------------------|------------------|---------------------|
| 2005-05-06/Fjchch022 | 819.33 ± 66.73 | 164.33 ± 34.27 | 154.33 ± 33.47 | 360.00 ± 43.68 | 1190 |
| 2005-07-03/Fjchch024 | 8739.33 ± 147.27 | 1028.00 ± 190.82 | 870.67 ± 92.06 | 2072.00 ± 191.65 | 10000 |
| 2005-07-05/Fjchch023 | 22440.67 ± 701.14 | 1421.33 ± 153.65 | 1089.00 ± 147.29 | 1859.00 ± 156.31 | 26700 |
| 2005-07-04/Fjchch024 | 10450.33 ± 481.61 | 1155.00 ± 91.11 | 941.67 ± 69.28 | 2017.72 ± 162.81 | 13300 |
| 2005-07-05/Fjchch023 | 5427.33 ± 92.23 | 322.00 ± 32.19 | 258.67 ± 36.46 | 491.67 ± 61.62 | 6670 |
| 2005-07-05/Fjchch024 | 10564.67 ± 464.37 | 1422.00 ± 97.55 | 938.33 ± 55.23 | 2226.00 ± 159.36 | 16700 |
| 2005-07-25/Fjchch023 | 1652.00 ± 364.75 | 99.00 ± 20.52 | 59.33 ± 22.23 | 193.00 ± 32.39 | 2000 |
| 2005-08-24/Fjchch021 | 235.33 ± 27.06 | 19.67 ± 7.57 | 14.33 ± 10.12 | 72.00 ± 20.87 | 407 |
| 2005-08-24/Fjchch024 | 367.67 ± 73.00 | 83.33 ± 22.85 | 51.33 ± 12.01 | 181.67 ± 26.18 | 667 |

注:采样测站及名称详见图 1-B

Notes: Sampling stations and its name are provided in Fig. 1-B

2.3 闽东及厦门海域现场赤潮样品中微小原甲藻的检测结果 来自闽东福宁湾的赤潮样品中检测出了较高密度的微小原甲藻 (*Prorocentrum minimum*),其中 2005 年 6 月 18 日 MD1X, MD2X 是取自养殖场蓄水池中的水样,这些海水直接来自福宁湾,表明这些海域有可能发生过微小原甲藻的赤潮,而微小原甲藻也是闽东这一带海域的常见赤潮原因种。养殖池中海水的微小原甲藻密度相对较低,其原因不详。在厦门海域,2005 年 7 月 4、5 日先后在 2 个测站的样品中检出了微小原甲藻,2005 年 7 月 5 日 Fjchch021 测站的微小原甲藻密度最高,达到了 10^4 的数量级。将 3 类检测手段进行比较,发现 ConA 检测的结果较寡核苷酸探针高,二者均低于明视野下的显微镜计数,但差异不如前叙塔玛亚历山大藻和纤小裸甲藻那么大。寡核苷酸探针中,PM18S02 和 PM28S02 的检测结果较为接近。检测结果为: bright field > ConA > PM18S02 > PM28S02(表 4)。

2.4 3 类分子探针检测效果的比较

图 2 给出了各类探针的检测效果,这些探针

能从复杂的背景中把目标赤潮生物识别出来。检测效果显示寡核苷酸探针对塔玛亚历山大藻、微小原甲藻和纤小裸甲藻标记的荧光信号相对弱一些。3 种 lectin 探针对相应目标藻的标记信号较强,大多数目标藻均能显示明亮的绿色荧光信号,表明细胞表面的糖基和探针发生了特异性结合,但也存在一定的背景干扰。PNA 探针对纤小裸甲藻标记的荧光信号明显强于同序列的寡核苷酸探针,几乎能和 lectin 探针的标记效果相当,但比 lectin 探针的特异性强。样品经过甲醇长达 24 h 的脱色处理,基本能脱去大部分藻体的自发黄色或红色荧光;膜杂交方法存在一定的背景干扰,用预过滤的方法可显著减少背景干扰。

表 5 给出了 3 类探针对目标藻的平均检出率。Lectin 探针平均检出率相对其他两类探针要高出很多,与明视野下的计数结果曾现出很好的相关性,但检出密度比较低,偏离 1:1 的中线。结果提示,明视野下计数可能会把相似种的细胞和死细胞等都计数进来,从而导致结果高估。Lectin 探针检测的结果高于寡核苷酸探针,是因为寡核

苷酸探针特异性虽高,但不能检测出死细胞和生理活性差、RNA含量低的目标细胞,且Lectin探

针也存在着一一定的交叉反应,容易受复杂背景的干扰。

表4 不同探针对2005年东海及厦门西海域赤潮样品中微小原甲藻的检出数量和测站分布

Tab.4 Cell number and its distribution of *Prorocentrum minimum* in East China Sea and Western Xiamen Bay estimated by different probes in 2005

| 采样时间及测站 sampling time and stations | ConA | PM18S02 | PM28S02 | 明视野 bright field |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| 2005-06-18/MD1X | 904.67 ± 85.20 | 874.67 ± 136.65 | 629.67 ± 71.60 | 1360 ± 91.65 |
| 2005-06-18/MD2X | 887.00 ± 99.95 | 730.00 ± 157.87 | 577.00 ± 136.72 | 1140.00 ± 120.00 |
| 2005-06-18/MD1Y | 241.67 ± 31.79 | 182.67 ± 21.73 | 131.67 ± 40.10 | 366.00 ± 103.94 |
| 2005-06-18/MD2Y | 176.00 ± 37.27 | 81.33 ± 13.65 | 45.00 ± 14.80 | 239.00 ± 83.72 |
| 2005-06-18/MD7Y | 473.67 ± 49.24 | 392.67 ± 22.19 | 232.67 ± 33.56 | 642.67 ± 74.19 |
| 2005-07-04/Fjchch021 | 916.33 ± 89.18 | 758.00 ± 38.59 | 749.00 ± 42.93 | 1250 |
| 2005-07-05/Fjchch021 | 27337.00 ± 557.11 | 11488.67 ± 303.79 | 11365.00 ± 208.04 | 33300 |
| 2005-07-05/Fjchch022 | 4237.33 ± 312.38 | 3372.00 ± 291.67 | 3196.67 ± 176.00 | 6670 |

注:采样测站及名称详见图1-B。此外,MD1X,MD2X,MD1Y,MD2Y,MD7Y是闽东霞浦县养殖池的名称

Notes: Sampling stations and its name are provided in Fig. 1-B. MD1X,MD2X,MD1Y,MD2Y,MD7Y are names of cultivation pond in Xiapu county of the East Fujian Province

表5 不同探针对相应目标藻的平均检出率

Tab.5 The percentage of target HAB species detected by its relevant probes

| 目标藻 target species | 探针 probes | 检出率(%) percentage |
|-------------------------------|--------------|----------------------|
| 塔玛亚历山大藻 <i>A. tamarens</i> | DBA | 84.91 |
| | Tama28S | 3.39 |
| | Tama5S | 1.67 |
| | WGA | 78.18 |
| 纤小裸甲藻 <i>T. pulchellum</i> | TP18S02 | 7.36 |
| | TP28S01 | 5.64 |
| | PNATP28S01 | 12.20 |
| 微小原甲藻 <i>P. minimum</i> | ConA | 78.22 |
| | PM18S02 | 39.76 |
| | PM28S02 | 37.64 |

表5还显示,不同寡核苷酸探针的阳性率也有差异,如Tama28S和Tama5S,PM18S02和PM28S02的平均检出率较为接近。PNATP28S01探针的平均检出率显著高于同序列寡核苷酸探针TP28S01($P < 0.01$),是其2.16倍,同时也比寡核苷酸探针TP18S02的平均检出率高。表明PNA探针能用于对现场复杂样品进行检测,且灵敏度高,检出信号强烈,探针结合能力很强,是可能应用于现场赤潮生物监测的理想工具。

3 讨论

探针检测数量和显微镜观察的结果存在差异,是因为检测样品主要受到下列因素的影响:①RNA的降解:虽然样品固定中加入了RNA酶抑制剂,样品在非低温下保存(4℃),以及长时间处理过程,会导致RNA降解。②样品处理过程中细胞的损失(主要在浓缩、离心、过滤等操作环节)。③样品固定和脱色的影响。有些样品用多聚甲醛固定造成后期脱色效果欠佳,干扰探针的检测效果。④样品中目标赤潮藻可能处于非指数增长期,带来检测信号过弱的问题。⑤探针的特异性和准确性尚需要进一步验证。⑥样品本身原因,比如种类组成复杂,如来自东海的样品中塔玛亚历山大藻可能不是优势种类,链状亚历山大藻(*A. catenella*)有可能是这次赤潮的主要原因种,而在显微镜下却很难区分它们。

根据日本学者Hosoi-Tanabe的建议(个人通讯),在1%多聚甲醛固定的情况下,采用甲醇和丙酮长时间脱色(超过24h以上),基本上可脱去红色荧光和大部分黄色荧光,有时还是会干扰探针的标记效果(如微小原甲藻)。长期保存样品时,Kulis推荐使用甲醛/甲醇溶液保存法(Kulis,个人通讯)。样品处理的过程中会涉及到细胞的损失问题,最好用过滤方法取代离心法^[5]。

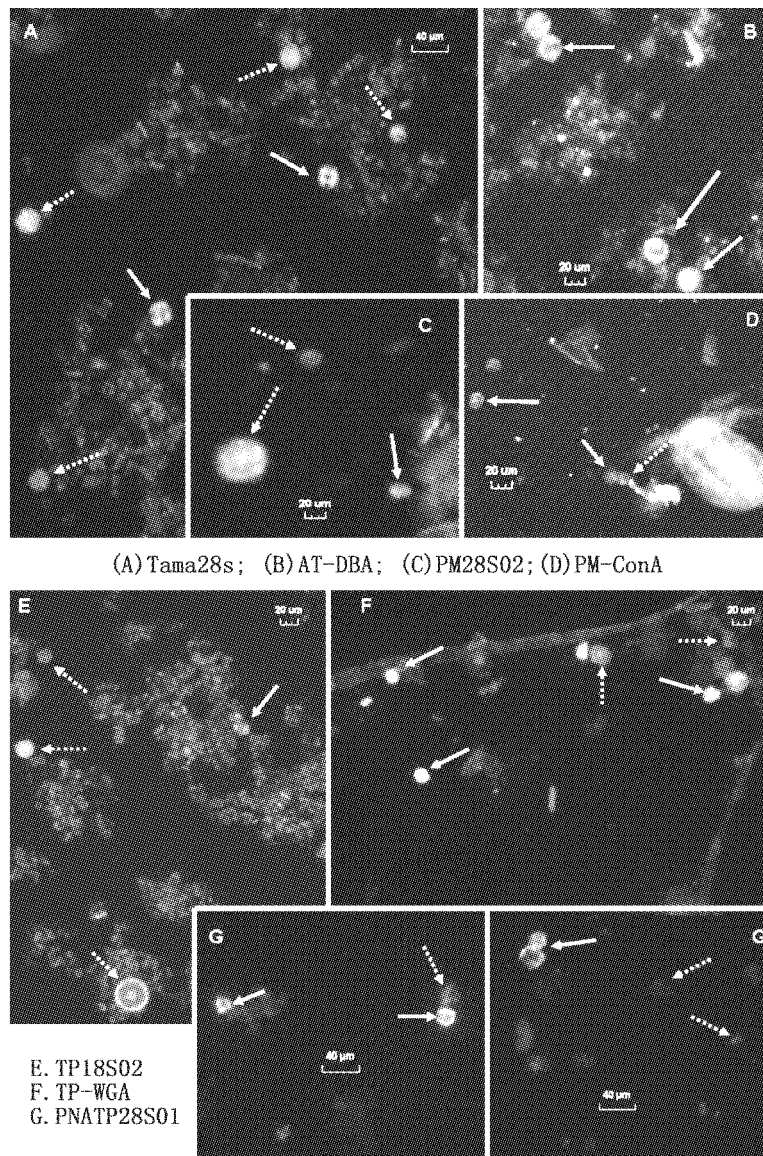


图2 细胞凝集素、寡核苷酸和肽聚酸

特异性探针检测现场赤潮样品的典型荧光显微镜照片效果图

Fig.2 Epifluorescence micrographs showing some representative labellings of algae in

red tide samples using specific fluorescence-conjugated probes such as lectin, oligonucleotide and PNA

AT,塔玛亚历山大藻;PM,微小原甲藻;TP,纤小裸甲藻,其余探针名见表1。实心箭头指示阳性细胞;虚箭头指示阴性细胞

AT, *A. tamarense*; PM, *P. minimum*; TP, *T. pulchellum*. Probes name are provided in Tab.1. The solid arrowhead showed positive algal cells, and the dot arrowhead showed negative cells

我们的实验结果表明,过滤时采用核孔膜优于聚碳酸酯滤膜。在减轻背景干扰方面,日本学者 Hosoi-Tanabe 建议,在杂交处理前,需先用不同孔径的筛绢进行预过滤(Hosoi-Tanabe, 个人通讯)。样品检测信号的强弱与核糖体中 RNA 的拷贝数有关^[19]。赤潮爆发时赤潮原因种往往处于细胞生长最旺盛期,此时通过分子探针可以灵敏

地检测出目标赤潮藻种^[20]。样品长时间保存需加入 RNA 酶抑制剂,在 -20 °C 下存放;或者固定后尽快处理样品。-80 °C 和 -20 °C 保存效果相差不多,都优于 4 °C 下的保存效果^[5]。另外,明视野下的计数很可能把目标藻的疑似种都计数进来,导致明视野计数结果偏高;此时由于探针计数的特异性,能比较准确地识别现场样品中的目标

赤潮生物^[5,15]。但由于现场样品过于复杂,赤潮生物组成多样,针对目标生物组成的情况,要考虑采用针对相似目标赤潮生物设计的多探针检测体系,采用不同的荧光标记手段,以便能同时对一个样品中的多种靶细胞进行有效识别(Anderson,个人通讯)。

在3类探针中,以lectin探针的平均检出率最高,检测信号也很强,但还不足以说明其特异性就高,因为检测效果受到现场样品诸多因素的制约。这与lectin本身的特点有很大的关系。lectin是一类非免疫源性的糖结合蛋白或糖蛋白,有聚集细胞的活性,能非共价特异性地结合细胞表面的单糖或寡糖等糖基^[9,21]。lectin的这些特性使其成为研究细胞表面糖结构非常适用的探针,应用于生物学的诸多领域如微生物分类学,研究细菌类型和单细胞生物。细胞表面糖基也有着相似性,如果lectin种类不是足够多,就难以对细胞表面共有的糖基和特异性糖基进行识别,容易发生交叉反应^[21]。

对于寡核苷酸和PNA探针而言,由于赤潮藻通常具有很明显的地域遗传特点,根据一个地区特定的种类开发的探针并不适用于其它地区的同一种类,因此需要开发针对中国海域地理株适用的特异性探针^[4]。针对不同靶序列设计的探针其杂交或检出率有一定差异,这可能和这些样品中RNA含量或靶序列的拷贝数量有一定关系^[4,20]。靶序列存在着复杂的二级结构,导致寡核苷酸探针的杂交存在困难,可添加无标记的辅助探针来解决这个问题^[4]。和寡核苷酸探针比较,PNA探针的杂交可不受这个问题的影响,因为PNA的特性使得杂交能在低盐和较高温度的条件下进行,这些条件明显地降低了rRNA和DNA二级结构的稳定性,因此使PNA探针能有效地和平常难到达的靶位点发生结合^[6,22]。在一些全细胞杂交方法中,可以使用PNA探针有效地穿透目标生物疏水的细胞壁,这归因于PNA探针的疏水特性^[22]。

通过对现场样品的实际检测验证,建立了3类分子探针的现场应用方法,证实了细胞凝集素、寡核苷酸、肽核酸探针是能用于对自然样品进行检测的较为有效工具。本研究还只是这3类分子探针方法对现场样品检测的初步验证;对于各探针的检测效能,我们目前仅依据荧光显微镜和光

学显微镜的检出数量来进行排序。鉴于检测中的假阳性和信号过低的问题,我们准备在未来的研究中继续探索更有效的方法,包括采用流式细胞技术(FCM)、酰胺信号扩增技术(TSA)等,为分子探针技术应用于赤潮检测的理论与实践提供更有力的证据。

厦门市鼓浪屿海洋环境监测中心站、赤潮973项目航次、福建宁德市霞浦县长沙村大弹涂鱼养殖场在现场样品的采集方面给予了通力协作;美国 Woods Hole 海洋研究所的 Dave Kulis 博士和 Donald M. Anderson 教授、日本 Shiga Prefecture 大学环境学院的 Shoko Hosoi-Tanabe 博士为实验提供了许多方法指导及资料上的帮助,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] 侯建军,黄邦钦,戴相辉. 赤潮藻细胞计数方法的比较研究[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(8): 907-908.
- [2] 侯建军,陈纪新,黄邦钦. 赤潮生物检测的分子探针技术研究进展[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(9): 1127-1129.
- [3] Scholin C A, Marin R, Miller P E, *et al.* DNA probes and a receptor binding assay for detection of *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) species and domoic acid activity in cultured and natural samples. [J] J Phycol, 1999, 35: 1356-1367.
- [4] Chen J X, Huang B Q, Jiao N Z, *et al.* Fluorescent in situ hybridization with oligonucleotide probes to identify *Alexandrium tamarense* and genus *Alexandrium* [C]//Ho K C, Lu S H, Yu T S, eds. Recent advances in the prevention and management of harmful algal blooms in the South China Sea. Proceedings of the international conference on the prevention and management of harmful algal blooms in the South China Sea (HABSCS2003), Hong Kong, 2003: 81-88.
- [5] Hosoi-Tanabe S, Sako Y. Rapid detection of natural cells of *Alexandrium tamarense* and *A. catenella* (Dinophyceae) by fluorescence in situ hybridization[J]. Harmful Algae, 2005, 4: 319-328.
- [6] Worden A Z, Chisholm S W, Binder B J. *In situ* hybridization of *Prochlorococcus* and *Synechococcus* (marine cyanobacteria) spp. with rRNA-targeted peptide nucleic acid probes [J]. Appl Environ Microbiol, 2000,

- 66: 284 - 289.
- [7] Litaker R W, Vandersea M W, Kibler S R. Life cycle of the hetero trophic dinoflagellate *Pfiesteria piscicida* (Dinophyceae)[J]. J Phycol, 2002, 38 (3): 442 - 463.
- [8] 侯建军,黄邦钦,赖红艳. 肽核酸探针技术在赤潮生物检测中的应用 [J]. 中国公共卫生, 2005, 21 (12): 1524 - 1526.
- [9] Hori K, Ogata T, Kamiya H. Lectin-like compounds and lectin receptors in marine microalgae: hemagglutination and reactivity with purified lectins[J]. J Phycol, 1996, 32: 783 - 790.
- [10] Cho E S, Costas E. Rapid monitoring for the potentially ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* in Korean coastal waters using fluorescent probe tools[J] J Plankton Res, 2004, 26(2):175 - 180.
- [11] Hou J J, Huang B Q, Hu J, et al. Fourteen FITC - conjugated lectins as a tool for the recognition and differentiation of some harmful algae in Chinese coastal water[J]. J Appl Phycol, DOI 10.1007/S10811 - 007 - 9178 - 3.
- [12] 周名江,颜 天,邹景忠. 长江口邻近海域赤潮发生区基本特征初探[J]. 应用生态学报, 2003, 14 (7): 1031 - 1038.
- [13] 许珠华,侯建军. 福建沿海赤潮的发生特点及防止措施[J]. 台湾海峡, 2006, 25(1): 143 - 149.
- [14] Amann R. *In situ* identification of microorganisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes[M]// Akkermann AD L, VanElsas J D, de-Brujin F J, eds. Molecular microbial ecology manual. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 1995: 1 - 15.
- [15] Anderson D M, Kulis D M, Keafer B A. Detection of the toxic dinoflagellate *Alexandrium fundyense* (Dinophyceae) with oligonucleotide and antibody probes: variability in labeling intensity with physiological condition[J]. J Phycol, 1999, 35: 870 - 883.
- [16] Rhodes L, Haywood A, Adamson J. DNA probes for the detection of *Karenia* species in New Zealand's coastal waters [C]// Steidinger K, Landsberg J, Vargo G, eds. Harmful algae 2002. Florida fish and wildlife cons comm, Florida Inst. Oceanography and IOC of UNESCO, 2004: 273 - 275.
- [17] Costas E, Gonzalez-Chavarri E, Aguilera A. Use of lectins to recognize and differentiate unicellular algae [J]. Bot Mar, 1993, 36: 1 - 4.
- [18] Hou J J, Huang B Q. Development of PNA probe technology on detection of *Takayama pulchellum* [C]// Ho K C, Lu S H, Wang Y, eds. Key research findings to harmful algal blooms in the South China Sea. Proceedings of the 3rd international conference on the prevention and management of harmful algal blooms in the South China Sea (HABSCS2006), Hongkong, 2006: 368 - 374.
- [19] Simon N, Lebot N, Marie D. Fluorescent *in situ* hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes to identify small phytoplankton by flow cytometry[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61 (7): 2506 - 2513.
- [20] 梁君荣,高亚辉,高 扬. 分子探针和全细胞杂交方法在赤潮甲藻锥状斯氏藻检测和鉴定中的应用 [C]// 何建宗,吕颂辉,俞子修,等(编).南中国海红潮预防和管理的的前沿发展. 香港:南中国海赤潮学会出版, 2003: 63 - 69.
- [21] Goldstein I J, Hughes R C, Monsigny M. What should be called a lectin[J]. Nature, 1980, 285: 66 - 69.
- [22] Stender H, Lund K, Petersen K H. Fluorescence *in situ* hybridization assay using peptide nucleic acid probes for differentiation between tuberculous and nontuberculous mycobacterium species in smears of mycobacterium cultures[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37: 2760 - 2765.

Detection of representative harmful algae using three kinds of molecular probes

HOU Jian-jun^{1,2,3}, LAI Hong-yan^{1,3}, LEI Hong-ling³, HUANG Bang-qin²

(1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

3. Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province,
Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China)

Abstract: Molecular probes are useful to separate closely related harmful algal bloom species. Moreover, they can rapidly and clearly differentiate non-toxic from toxic algae and to monitor the development of algal blooms in coastal waters. There are three kinds of molecular probes which can be used for identification of HAB species, such as lectin, DNA and peptide nucleotide acid(PNA) probe. These probes are relatively new, and have higher sensitivity, veracity and specificity than traditional taxonomic techniques. In the present study, probes of oligonucleotide, lectin and PNA were applied to detect *Proocentrum minimum*, *Takayama pulchellum* and *Alexandrium tamarensis* of red tide samples from the East China Sea, Eastern Fujian Coastal Waters and Xiamen Bay, series of studies were undertaken in order to identify and classify these harmful algal species, and the sample processing and detection protocols were evaluated and optimized both in the laboratory and in the field. The results showed that target species of *A. tamarensis* was detected successfully in samples of the East China Sea and Xiamen Bay, and the detection efficiency of different probes specific to *A. tamarensis* was in order: DBA (lectin) > Tama28 S (oligonucleotide probe) > Tama5S (oligonucleotide probe). The target species of *P. minimum*, was also detected successfully in samples of Eastern Fujian Coastal Waters and Xiamen Bay, and the detection efficiency of different probes specific to *P. minimum* was as follow: ConA (lectin) > PM18S02 (oligonucleotide) > PM28S02 (oligonucleotide). The target species of *T. pulchellum*, which was firstly isolated and unialgal cultivated during blooms in Xiamen Bay in 2003 and 2004, was also identified distinctly in samples of Xiamen Bay during blooms in 2005, and the detection efficiency of different probes specific to *T. pulchellum* was in this order: WGA (lectin) > PNATP28S01 (PNA) > TP18S02 (oligonucleotide) > TP28S01(oligonucleotide). The conclusions were as follow: These target harmful algae bloom species cells appearance in the East China Sea, Eastern Fujian Coastal Waters and Xiamen Bay identified by three probes were correlated well to previous results of references, which suggested that specificity of these probes was good and the detecting methods were accurate and reliable. The specificity of three molecular probes was that PNA probe > oligonucleotide probe > lectin probe in order. Thereby, these probes can be used for monitoring marine population dynamics of *P. minimum*, *T. pulchellum* and *A. tamarensis* rapidly in future.

Key words: red tide species; oligonucleotide; peptide nucleotide acid; lectin; probe