

## 异硫氰酸荧光素标记鳃弧菌条件优化及 应用条件对荧光信号的影响

王锐<sup>1,2</sup>, 王秀华<sup>2\*</sup>, 王玉娟<sup>2</sup>, 韩雯<sup>2</sup>, 黄健<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 为了实现对目标细菌的有效示踪, 实验以异硫氰酸荧光素(FITC)为标记物, 分别设置FITC标记浓度0.2、2、20、50、100、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 标记时间1、15、30、60、120、240 min, 研究了FITC标记浓度与标记时间对鳃弧菌标记效果的影响, 同时对在不同温度(25、4、-20、-70  $^{\circ}\text{C}$ )及不同时间(24、48、96、192 h)存储条件下鳃弧菌标记荧光的稳定性进行了比较, 对标记鳃弧菌经甲醛灭活后的荧光变化进行了观察, 研究了不同光照条件(0、150、1 500、25 000 lx)对标记鳃弧菌的荧光衰减影响, 以及在-20和-70  $^{\circ}\text{C}$ 条件下反复冻融对标记鳃弧菌荧光强度的影响。结果表明, FITC的最适标记浓度范围为20~100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 最适标记时间范围60~120 min, 储藏在-20和-70  $^{\circ}\text{C}$ 条件下, 标记后的鳃弧菌荧光信号比储藏在4和25  $^{\circ}\text{C}$ 条件下稳定, 标记后的鳃弧菌经甲醛灭活后的荧光信号稳定性优于对照组, 不同强度自然光照对标记鳃弧菌的荧光衰减效果不明显, 标记细菌经3次冻融, 发现在-70  $^{\circ}\text{C}$ 条件下冻存的细菌荧光信号稳定性保持良好。本研究结果为FITC用于标记海洋细菌提供了实用的技术参数。

**关键词:** 鳃弧菌; 异硫氰酸荧光素; 荧光标记; 标记条件

**中图分类号:** S 917.1

**文献标志码:** A

细菌标记技术广泛用于细菌移位、细菌感染途径及疫苗学等研究领域<sup>[1-3]</sup>。经过标记, 便于实现对目标细菌的观察识别, 从而达到对其定位及示踪的目的。目前常用的细菌标记技术主要有基因标记(插入GFP质粒)、同位素标记及荧光素标记<sup>[4-5]</sup>等。各种标记方法在标记效果、可操作性、安全性等方面均存在一定的差别。异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)是目前应用最广泛的荧光素, 最大吸收光波长为490~495 nm, 最大发射光波长520~530 nm, 在蓝光或紫外光照射下发出黄绿色荧光。FITC在微生物应用研究领域常被用作细菌标记物<sup>[6-8]</sup>, 但在应用过程中, 对其标记的最佳浓度、标记后的存储时间及保存条件等均未见相应的研究报告, 影响了

该荧光素的使用。

在水产养殖领域中, 大量的研究需要对海水环境中的细菌进行标记跟踪, 用于观察病原菌在动物养殖过程中的感染途径、病原在宿主组织及细胞中的分布、机体细胞对病原的去除过程<sup>[4,9-11]</sup>。同样, 对益生菌进行标记跟踪, 可掌握目标细菌在环境、宿主体表及肠道中的定殖区域、数量分布等, 利于探索有益细菌与宿主健康之间的关系<sup>[12]</sup>。

本实验采用FITC为标记物, 对海水环境中常见的几种病原菌及有益菌进行标记, 并对标记条件进行优化, 旨在探寻一种最适合的标记方法, 为后续研究海水养殖动物与其病原菌及有益菌间相互作用及途径提供有效的技术支撑。

收稿日期: 2013-11-19

修回日期: 2014-02-19

资助项目: 国家自然科学基金(31172440); 泰山学者建设工程专项经费

通信作者: 王秀华, E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

FITC 购自 Sigma, 分子量为 389.4, 纯度大于 95%, 最大吸收光波长为 495 nm, 最大发射光波长为 525 nm。实验用海水细菌包括鳗弧菌 (*Vibrio anguillarum*)、大菱鲆弧菌 (*V. scophthalmi*)、哈维氏弧菌 (*V. harveyi*)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 及一株未定名芽孢杆菌 (*Bacillus sp.*), 以上细菌均由本实验室分离保存。

### 1.2 实验方法

**细菌 FITC 标记** 将待标记细菌培养到指数生长中后期, 4 ℃ 5 000 × g 离心 10 min, 弃上清液, 用 PBS (0.01 mol/L、pH 7.4) 洗涤 2 次, 4 ℃ 5 000 × g 离心 10 min, 之后用碳酸盐缓冲液 (0.5 mol/L、pH 9.5) 配成浓度为  $0.5 \times 10^9$  cfu/mL 的悬菌液, 加入 FITC 溶液 (参照说明书), 使 FITC 在悬菌液中的终浓度为 50 ~ 100 μg/mL, 常温搅拌 1 ~ 2 h, 5 000 × g 离心 10 min, 弃上清液, 用 PBS 洗涤 2 次, 5 000 × g 离心 10 min, 取沉淀的细菌用 PBS 配成浓度为  $1 \times 10^9$  cfu/mL 的菌悬液。标记完成后经荧光显微镜检查确认, 4 ℃ 避光保存。

**细菌荧光信号的显微观察** 取 5 μL 标记后的细菌悬液涂于载玻片上, 盖上盖玻片在荧光显微镜 (Nikon eclipse 80i) 下观察细菌的荧光图像, 以出现清晰细菌荧光视野时视为标记成功。

**细菌荧光强度的检测** FITC 标记完成后, 立即取标记细菌悬液 100 μL, 置于 96 孔酶标板上, 用光谱扫描多功能读数仪 (VARIOSKAN Flash, Thermo Scientific, 美国) 进行相对荧光强度测量, 激发波长 480 nm, 每个样品设置 3 个平行, 结合荧光显微镜观察, 确定具有清晰细菌荧光图像的相对荧光强度为适宜的荧光强度。

**FITC 浓度对细菌标记效果的影响** 配制 FITC 浓度分别为 0.2、2、20、50、100、200 μg/mL 的细菌标记悬液, 对鳗弧菌进行标记, 标记完成后用光谱扫描多功能读数仪分别测定标记细菌的相对荧光强度, 再经荧光显微镜观察, 确定最适标记浓度。

**标记时间对荧光强度的影响** 采用最适 FITC 标记浓度 50 μg/mL (经预实验确定), 设置 FITC 与菌液作用时间分别为 1、15、30、60、120、

240 min, 对鳗弧菌进行 FITC 标记, 标记完成后用光谱扫描多功能读数仪测定标记细菌的相对荧光强度, 之后再经荧光显微镜观察, 确定最适标记时间。

**低温长时间保存对标记细菌荧光强度的影响** 采用预实验确定的最佳标记条件 (FITC 浓度: 50 μg/mL, 标记时间: 120 min) 标记鳗弧菌后, 将 FITC 标记的鳗弧菌分别置于 4 ℃ 和室温条件下, 分别储藏 1、2、4、8 d, 用荧光显微镜观察荧光衰减情况。

**标记细菌经甲醛灭活后荧光强度的稳定性**

分别选用浓度为 20、100、200 μg/mL 的 FITC 对鳗弧菌进行标记, 标记时间 120 min, 标记完成后用 0.15% 甲醛 24 h 充分灭活, 4 ℃ 5 000 × g 离心 10 min, 去除甲醛, 用无菌的 PBS (pH 7.4) 洗涤 3 次 (5 000 × g, 10 min), 最后用 PBS 重悬后, 取各标记浓度下的鳗弧菌涂片作为甲醛灭活标记细菌, 以未经甲醛灭活的标记鳗弧菌为对照。用荧光显微镜, 选用强紫外条件 (1 档) 对标记细菌进行照射, 观察记录各组荧光的衰减时间, 比较灭活前后标记细菌的荧光稳定性。衰减时间定义为, 从观察开始到荧光信号衰减到不可读时的时间。

**光照对标记细菌荧光信号的影响** 将最佳标记条件下标记的鳗弧菌涂片并封片, 采用光度计 (萌芽牌 ST-II 型, 北京师范大学光电仪器厂) 在室内 (25 ℃) 选取光照强度分别为 0、150、1 500、25 000 lx 自然光照条件 (自然光透过玻璃, 无紫外线), 分别将各待测细菌涂片, 暴露在各光照条件下, 累计暴露 72 h 后, 用荧光显微镜观察荧光衰减情况。

**存储温度对细菌荧光强度的影响** 将最佳标记条件下标记的鳗弧菌, 置于 25、4、-20、-70 ℃ 条件下, 分别储藏 24、48、96、192 h, 用光谱扫描多功能读数仪检测标记细菌的相对荧光强度。

**反复冻融对标记细菌荧光强度的影响** 将最佳标记条件下标记的鳗弧菌, 分别置于 -20 和 -70 ℃ 条件下冻存, 之后取出室温融化 (25 ℃), 反复 3 次, 用光谱扫描多功能读数仪检测每次融化后细菌的相对荧光强度。

**FITC 对其他海水细菌的标记效果** 按照本实验确定的鳗弧菌最适标记方法, 对大菱鲆弧

菌、哈维氏弧菌、蜡状芽孢杆菌及一株未定名芽孢杆菌进行标记,采用荧光显微镜对标记效果进行观察。

### 1.3 数据处理

实验数据采用平均值(mean) ± 标准差(SD)表示,应用 Excel 2010 作图。

## 2 结果

### 2.1 不同浓度 FITC 对鳗弧菌标记效果的影响

FITC 浓度在 0.2 ~ 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内,相对荧光强度随着 FITC 浓度的升高而增强,但在该浓度范围内相对荧光强度增加较平缓,仅由 1.89 增加至 75.94(图 1)。结合荧光显微镜观察,此荧光强度下细菌所带荧光较弱,不易识别。FITC 浓度在 20 ~ 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  范围内,随着浓度的升高,相对荧光强度迅速增强,结合显微镜观察,当相对荧光强度达到 100 ~ 200 时,细菌所带荧光易于观察,经综合比较,确定 FITC 的最佳浓度范围为 20 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

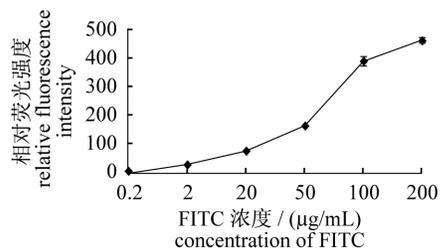


图 1 不同浓度 FITC 标记鳗弧菌相对荧光强度

Fig. 1 The relative fluorescence intensity of *V. anguillarum* labeled in different concentrations of FITC

### 2.2 标记时间与荧光强度的关系

用浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 FITC 标记鳗弧菌,结果显示,相对荧光强度随着标记时间的增加而增

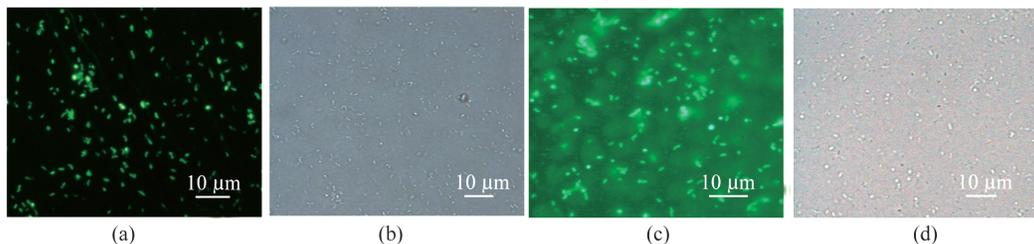


图 3 4 °C 避光条件下存放 FITC 标记鳗弧菌的荧光衰减情况

(a) 为标记鳗弧菌存放 1 d 后紫外光激发图; (b) 为(a) 在白光下的视野; (c) 为标记鳗弧菌存放 8 d 后紫外光激发图; (d) 为(c) 在白光下的视野

Fig. 3 The fluorescence attenuation of *V. anguillarum* labeled FITC stored at 4 °C

(a) is the fluorescence view of labelled *V. anguillarum* stored at 4 °C for 1 day; (b) is the view of(a) under white light; (c) is the fluorescence view of labelled *V. anguillarum* stored at 4 °C for 8 days; (d) is the view of(c) under white light

加(图 2)。标记时间为 1 min 时,细菌的相对荧光强度达到 119.33,将该标记时间的标记细菌在常温下储存 24 h 后进行涂片荧光显微检测,发现这种结合并不稳定,细菌呈现荧光减弱或无荧光的现象。标记时间为 15 ~ 60 min 时,相对荧光强度随着标记时间的延长缓慢上升,60 ~ 240 min 内,随着时间的增加,相对荧光强度逐渐加强,将该标记时间内的细菌在常温下储存 24 h 后涂片并进行荧光显微检测,发现细菌所带荧光清晰。经综合分析,确定 60 ~ 120 min 为细菌标记的适宜时间。

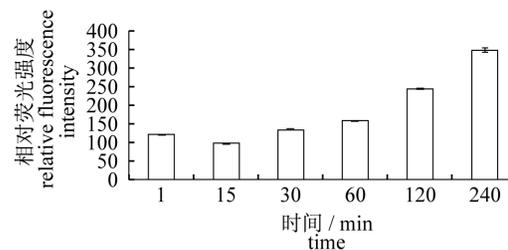


图 2 不同 FITC 标记时间条件下细菌相对荧光强度

Fig. 2 The relative fluorescence intensity of bacteria FITC-labeled at different time

### 2.3 4 °C 避光条件下存放 FITC 标记鳗弧菌荧光衰减情况

将最佳标记条件下标记的鳗弧菌置于 4 °C 条件下,避光存放。之后每隔 24 h 对其进行涂片荧光显微镜检测 1 次,分析所标记细菌的荧光衰减情况,经连续 8 d 观察,发现第 1 天所标记细菌荧光信号保持良好,可清晰识别(图 3-a)。从第 2 天之后,背景中荧光强度开始增强,到第 8 天时,标记细菌依然可见,但背景中的荧光信号增强(图 3-c),表明随着存放时间的延长,菌体蛋白与荧光素结合后有一定程度的降解。

## 2.4 标记细菌经甲醛灭活后荧光强度的稳定性

将各实验组标记后的鳗弧菌经 0.15% 甲醛 24 h 充分灭活后,采用紫外光激发照射,荧光显微镜检测,甲醛灭活后的 FITC 标记细菌与对照组相比,在相同强度的紫外光照射下,低浓度 (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 标记条件下灭活细菌荧光衰减时间与对照组相比差异不显著 (图 4)。高浓度 (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 标记条件下灭活细菌荧光衰减时间与对照组相比差异显著。随着标记浓度的增大,灭活组和对照组的衰减时间均延长。结果表明,荧光衰减时间随着标记浓度的增大而延长,细菌灭活剂可以增强标记细菌的稳定性。

## 2.5 自然光照对 FITC 荧光的衰减效果

将标记后的细菌涂片并封片,暴露在 0、150、1 500、25 000 lx 光照条件下,连续暴露 72 h 后,采用荧光显微镜检测,结果显示标记细菌均带有荧光,且暴露后鳗弧菌的荧光信号可视性良好,

但随着时间的延长,背景值有一定程度的增高 (图 5),图 5-a ~ 5-d 为各曝光强度下标记细菌暴露 24 h 时的荧光图片,图 5-e ~ 5-h 为在各曝光强度下暴露 72 h 时的荧光图片。

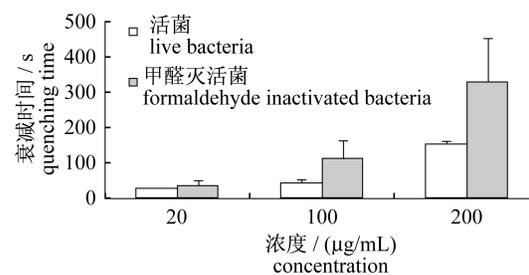


图 4 不同 FITC 标记浓度下细菌灭活与荧光衰减时间的关系

Fig. 4 The relationship between bacteria inactivation labeled in different concentration of FITC and fluorescence quenching time

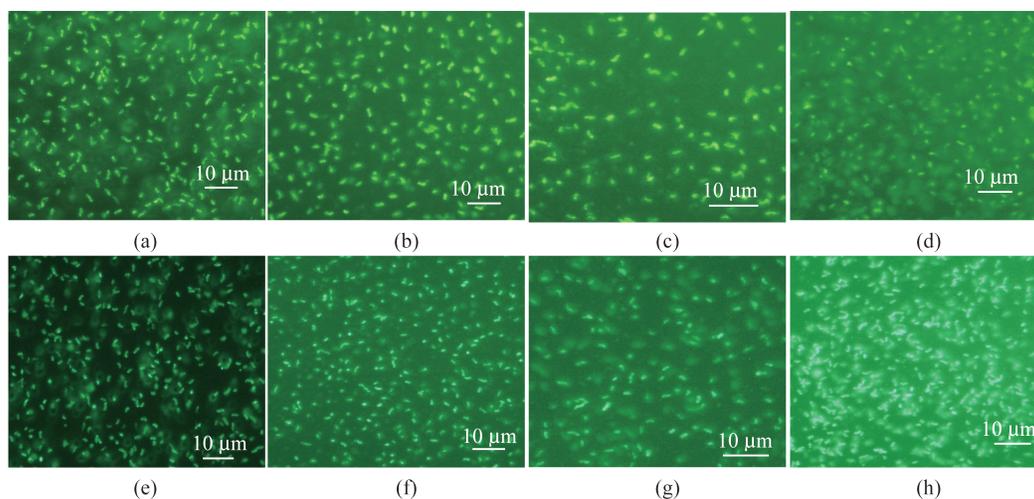


图 5 FITC 标记鳗弧菌在不同光照强度下暴露 24 和 72 h 的显微照片

(a)、(b)、(c)、(d) 分别为标记细菌在 0、150、1 500、25 000 lx 光照条件下暴露 24 h 后的紫外激发图片;(e)、(f)、(g)、(h) 分别为标记细菌在 0、150、1 500、25 000 lx 光照条件下暴露 72 h 后的紫外激发图片

Fig. 5 Photomicrographs of *V. anguillarum* labeled FITC exposure 24 and 72 h under different light intensities

(a), (b), (c), (d) show the effect of labeled bacteria exposed under the light intensity at 0, 150, 1 500 and 25 000 lx in 24 h respectively. (e), (f), (g), (h) show the effect of labeled bacteria exposed under the light intensity at 0, 150, 1 500 and 25 000 lx in 72 h respectively

## 2.6 储藏温度及储藏时间对 FITC 标记鳗弧菌荧光强度的影响

将鳗弧菌经浓度为 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 FITC 标记 120 min 后,分别储藏于 4、25、-20、-70  $^{\circ}\text{C}$  的温度条件下,分别经过 24、48、96、192 h 存放后,对其荧光信号进行测定。在 4 和 25  $^{\circ}\text{C}$  的储藏条件下,随着储藏时间的延长,相对荧光强度增加,从标记后 24 h 到 96 h 增加 150 ~ 200 个相对荧光强

度 (图 6),采用荧光显微镜观察,发现细菌菌体背景荧光信号升高 (图 7)。在低温 (-20 和 -70  $^{\circ}\text{C}$ ) 条件下,随着储藏时间的延长,相对荧光强度变化不大,采用荧光显微镜观察,发现低温条件下,细菌存储前后的荧光信号均有良好的可读性,菌体背景荧光信号没有明显增强,表明在 -20 和 -70  $^{\circ}\text{C}$  条件下保藏 FITC 标记细菌的效果优于 4 和 25  $^{\circ}\text{C}$  条件。

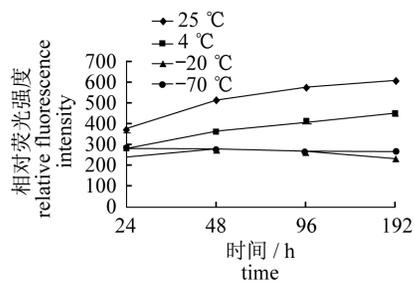


图6 不同储藏温度及储藏时间条件下FITC标记鳃弧菌的相对荧光强度  
Fig. 6 The relative fluorescence intensity of *V. anguillarum* labeled FITC at different storage temperature and time

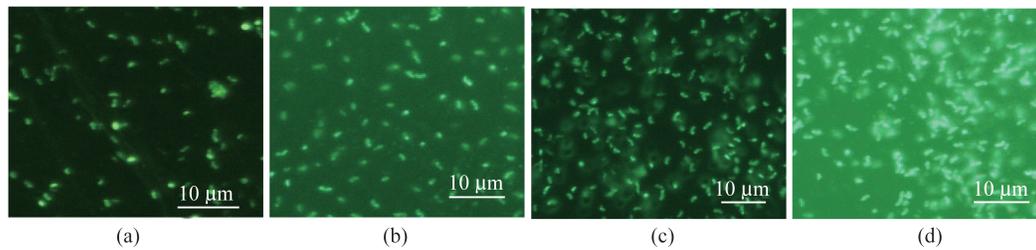


图7 FITC标记鳃弧菌在不同储藏温度条件下储藏24 h和96 h的显微照片  
(a) -20 °C储藏24 h; (b) 25 °C储藏24 h; (c) -20 °C储藏96 h; (d) 25 °C储藏96 h

Fig. 7 Photomicrographs of *V. anguillarum* labeled FITC storage 24 h and 96 h at different temperature  
(a) stored at -20 °C for 24 h; (b) stored at 25 °C for 24 h; (c) stored at -20 °C for 96 h; (d) stored at 25 °C for 96 h

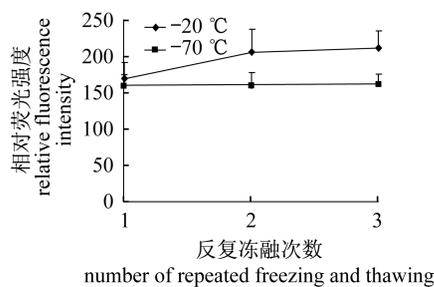


图8 反复冻融对FITC标记鳃弧菌相对荧光强度的影响  
Fig. 8 The effect of repeated freezing and thawing on the relative fluorescence intensity of *V. anguillarum* labeled FITC

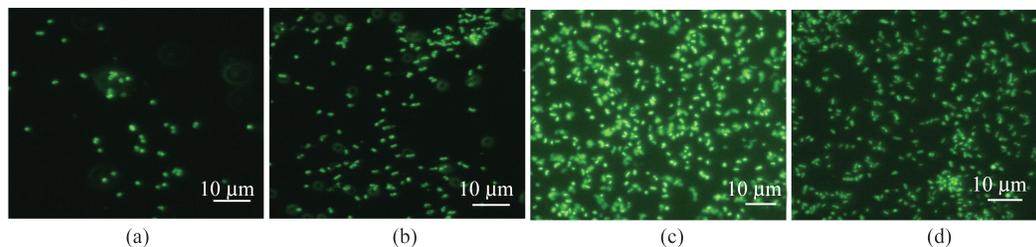


图9 不同海水细菌FITC标记效果  
(a)大菱鲆弧菌; (b)哈维氏弧菌; (c)蜡状芽孢杆菌; (d)未定名芽孢杆菌

Fig. 9 The effect of FITC labeled four different marine bacteria  
(a), (b), (c) and (d) represent *V. scopthalmi*, *V. harveyi*, *B. cereus* and *Bacillus* sp., respectively

## 2.7 反复冻融对FITC标记细菌荧光强度的影响

将FITC标记的鳃弧菌进行反复冻融,分析每次冻融后的细菌悬液相对荧光强度(图8)。由图可知,-20 °C条件下储存的标记细菌,反复冻融3次测得的相对荧光强度有所上升,采用荧光显微镜观察,发现细菌悬液经第2次融化后,菌体背景荧光信号增强。-70 °C条件下储存的标记细菌,反复冻融3次测得的相对荧光强度变化不明显,采用荧光显微镜观察,菌体背景荧光信号变化也不明显。说明标记的细菌置于-70 °C条件下保存,经过1~3次的反复冻融对标记效果影响不大。

## 2.8 不同海水细菌标记效果比较

采用FITC标记鳃弧菌的方法对大菱鲆弧菌、哈维氏弧菌、蜡状芽孢杆菌及一株未定名芽孢杆菌4种海水细菌进行标记(图9),可以看出FITC对该4种细菌同样具有良好的标记效果。

## 3 讨论

FITC是在荧光素的基础上,通过化学反应增加硫氰酸基团得到的一种可用于标记蛋白的荧光素。在碱性条件下,硫氰酸基团能与生物活性物质蛋白质中赖氨酸的氨基结合,经碳酰基化反应

形成硫碳氨基键,从而形成荧光蛋白标记物。异硫氰酸荧光素最早于 1958 年被开发用于荧光标记<sup>[13]</sup>。随着对 FITC 结构的认识与纯化程度的提高,FITC 作为荧光染料物质在科学研究中具有广泛的应用,目前已用于标记抗体<sup>[14-15]</sup>、脂多糖<sup>[16-17]</sup>、壳聚糖<sup>[18]</sup>、凝集素<sup>[19]</sup>及维生素叶酸<sup>[20]</sup>等生物活性物质,用于跟踪靶标物质出现的位置或代谢途径。FITC 同样在标记动物血细胞<sup>[21]</sup>及微生物方面具有广泛的应用<sup>[5,22]</sup>,用以定位相关细胞在机体中的位置。本实验开展了 FITC 标记水产养殖动物病原鳃弧菌的相关研究,确定了 FITC 标记鳃弧菌的最佳浓度范围、适宜标记时间,探讨了标记后存储温度、光线及化学物质等因素对标记复合物的荧光淬灭影响,为 FITC 用于鳃弧菌等海洋细菌的标记提供了标记参数。

FITC 作为标记物,其标记效果与标记物的种类及 FITC 的浓度有密切关系。已有的研究结果表明,用浓度 0.15 mg/mL 的 FITC 标记野生型 *Porphyromonas gingivalis*、蛋白酶突变株 *P. gingivalis* 及大肠杆菌 *E. coli* 效果良好,而标记 *P. gingivalis* ATCC 33277 选用浓度为 0.015 mg/mL 时标记效果好<sup>[5]</sup>,两者浓度相差 10 倍。Weingart 等<sup>[22]</sup>在进行人类病原菌百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*) FITC 标记时,选用的 FITC 浓度则更高,达到 0.5 mg/mL。本研究表明,用 FITC 标记鳃弧菌时, FITC 的最适浓度范围为 20 ~ 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,在此浓度下适宜的标记时间范围为 60 ~ 120 min。不同细菌间 FITC 标记浓度存在差异,表明细菌种(株)系之间其表面的蛋白或糖类组成存在差异,与 FITC 的结合程度不同,提示在对未知菌进行标记时, FITC 的浓度范围需要提前确定。

FITC 荧光素用于生物标记,会对待标记蛋白或细胞的生物活性产生影响,Weingart 等<sup>[22]</sup>用 FITC 标记人类病原菌百日咳杆菌时发现,百日咳杆菌经 FITC 标记后,该菌逃避吞噬细胞吞噬的能力受到影响;而当用 FITC 标记塔西单抗 (tocilizumab)后,其与白细胞介素 (IL-6R) 受体的结合力降低<sup>[14]</sup>,类似的用 FITC 标记脂肪酶后,脂肪酶的耐酸碱及耐热的能力提高<sup>[23]</sup>。对于荧光素导致的被标记物生物活性的改变,有学者认为是抗体抗原的结合位点被 FITC 封闭,后续的反应受阻<sup>[14]</sup>,或者 FITC 与被标记的酶结合后,导致酶分子的空间构相发生变化<sup>[23]</sup>。因此,在应用

FITC 标记鳃弧菌等海水养殖动物细菌病原时,标记后细菌的感染能力、细菌与抗体的结合能力等可能会发生改变,提示在应用 FITC 标记的细菌进行生物学相关研究中,标记前后细菌生物学活性的改变需要被加以关注。

本研究在使用荧光酶标仪检测 FITC 标记的鳃弧菌悬液时,发现标记液相对荧光强度会随着标记时间的延长而增强,结合荧光显微镜图片观察,发现菌体的背景值会随着标记时间的延长而升高,而被标记的细菌的荧光强度没有明显增强,表明 FITC 与细菌蛋白结合后,随着存储时间的增加,菌体中与 FITC 结合的蛋白出现分解,释放到环境中,导致荧光检测的背景值升高。

#### 参考文献:

- [1] Song D S, Li Y S, Yu B J, *et al.* GFP labeling *Escherichia coli* TG1 tracks bacterial translocation [J]. *Parenteral & Enteral Nutrition*, 2006, 13 (2): 65 - 67, 70. [宋德胜,李幼生,于宝军,等.应用绿色荧光蛋白标记技术示踪细菌移位的实验研究.肠外与肠内营养,2006,13(2):65 - 67,70.]
- [2] O'Toole R, von Hofsten J, Rosqvist R, *et al.* Visualisation of Zebrafish infection by GFP-labelled *Vibrio anguillarum* [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2004, 37 (1): 41 - 46.
- [3] Beyer W, Böhm R. Labeling *Salmonella* live vaccine strains with the lux operon from *Vibrio fischeri* improves their detection and discrimination from wild type [J]. *Microbiological Research*, 1996, 151 (4): 407 - 419.
- [4] Hong H S, Ke L, Huang B Q, *et al.* The grazing rate of *Strombidium succatum* using a modified fluorescence-labeled technique [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2001, 32 (3): 260 - 266. [洪华生,柯林,黄邦钦,等.用改进的荧光标记技术测定具沟急游虫的摄食速率.海洋与湖沼,2001,32(3):260 - 266.]
- [5] Pathirana R D, O'Brien-Simpson N M, Visvanathan K, *et al.* The role of the RgpA-Kgp proteinase-adhesin complexes in the adherence of *Porphyromonas gingivalis* to fibroblasts [J]. *Microbiology*, 2008, 154 (10): 2904 - 2911.
- [6] Li Y, Dick W A, Tuovinen O H. Evaluation of fluorochromes for imaging bacteria in soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2003, 35 (6): 737 - 744.
- [7] Cantiniaux B, Hariga C, Courtoy P, *et al.*

- Staphylococcus aureus* phagocytosis: A new cytofluorometric method using FITC and paraformaldehyde [ J ]. *Journal of Immunological Methods*, 1989, 121 ( 2 ) : 203 - 208.
- [ 8 ] Medici M, Vinderola C G, Perdígón G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese [ J ]. *International Dairy Journal*, 2004, 14 ( 7 ) : 611 - 618.
- [ 9 ] Zhang X J, Zhan W B, Chen C Z, *et al.* Studies on the infection and pathogen of *Edwardsiella tarda* in flounder *Paralichthys olivaceus* [ J ]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2005, 29 ( 1 ) : 31 - 37. [ 张晓君, 战文斌, 陈翠珍, 等. 牙鲆迟钝爱德华氏菌感染症及其病原的研究. *水生生物学学报*, 2005, 29 ( 1 ) : 31 - 37. ]
- [ 10 ] Cao H C, Wang M Z, Wang H R, *et al.* Research for growth rapid of phagocytosis of rumen protozoa on bacteria by fluorescence labeled bacteria [ J ]. *Nutrition and Feedstuffs*, 2009, 45 ( 15 ) : 41 - 43. [ 曹恒春, 王梦芝, 王洪荣, 等. 荧光染色标记细菌法对瘤胃原虫吞噬细菌速率的研究. *营养饲料*, 2009, 45 ( 15 ) : 41 - 43. ]
- [ 11 ] Cao H C, Wang H R, Wang M Z, *et al.* Effects of *Yucca Schidigera* on determination of bacterial predation rate by rumen protozoa based on a fluorescence-labeled technique [ J ]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2009, 21 ( 3 ) : 417 - 422.
- [ 12 ] Zhang L. Screening and exploring the functional mechanisms and applications effects of a probiotic from shrimp intestine [ D ]. Qingdao: Ocean University of China, 2007. [ 张玲. 一株对虾肠道益生菌的筛选及其作用机理和应用效果的研究. 青岛: 中国海洋大学, 2007. ]
- [ 13 ] Sinsheimer J E, Jagodic V, Burckhalter J H. Fluorescein isothiocyanates: Improved synthesis and purity: Spectral studies [ J ]. *Analytical Biochemistry*, 1974, 57 ( 1 ) : 227 - 231.
- [ 14 ] Takai H, Kato A, Nakamura T, *et al.* The importance of characterization of FITC-labeled antibodies used in tissue cross-reactivity studies [ J ]. *Acta Histochemica*, 2011, 113 ( 4 ) : 472 - 476.
- [ 15 ] Ning B T, Tang Y M, Shen H Q, *et al.* Preparation and characterization of a directly labeled mouse anti-human CD14 monoclonal antibody ZCH-2F9-FITC [ J ]. *Journal of Zhejiang University: Medical Sciences*, 2005, 34 ( 2 ) : 167 - 171, 190. [ 宁铂涛, 汤永民, 沈红强, 等. 直标鼠抗人 CD14 单克隆抗体 2F9-FITC 的研制及鉴定. *浙江大学学报: 医学版*, 2005, 34 ( 2 ) : 167 - 171, 190. ]
- [ 16 ] Trubetskoy V S, Koshkina N V, Omel' yanenko V G, *et al.* FITC-labeled lipopolysaccharide: use as a probe for liposomal membrane incorporation studies [ J ]. *Federation of European Biochemical Societies*, 1990, 269 ( 1 ) : 79 - 82.
- [ 17 ] Li Y N, Cao H W, Zheng J, *et al.* Labeling of lipopolysaccharide with fluorescein isothiocyanate and its application [ J ]. *Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae*, 2009, 31 ( 9 ) : 822 - 824. [ 李宇宁, 曹红卫, 郑江, 等. 一种高效 FITC 标记 LPS 方法的建立及应用. *第三军医大学学报*, 2009, 31 ( 9 ) : 822 - 824. ]
- [ 18 ] Ouyang H Y, Gao L W, Wang J W, *et al.* Preparation of succinyl-chitosans and their affinity with HL-60 cells [ J ]. *Materials Review*, 2009, 23 ( 10 ) : 93 - 97. [ 欧阳海燕, 高立文, 王剑文, 等. 琥珀酰壳聚糖的制备及其与 HL-60 细胞亲和性的研究. *材料导报*, 2009, 23 ( 5 ) : 93 - 97. ]
- [ 19 ] Ghazizadeh M, Takigawa H, Fujimura N, *et al.* Direct immunofluorescence for ABH blood group isoantigens: Use of FITC-conjugated lectins [ J ]. *Urology*, 1983, 22 ( 4 ) : 381 - 384.
- [ 20 ] Xie J, Zhu J H. Synthesis and imaging study on the FITC labeled folic derivative [ J ]. *Chemical Research in Chinese Universities*, 2011, 32 ( 7 ) : 1532 - 1536. [ 谢江, 朱建华. FITC 标记的叶酸类衍生物的合成及显像研究. *高等学校化学学报*, 2011, 32 ( 7 ) : 1532 - 1536. ]
- [ 21 ] Ren S P, Ma E P, Liu X Z, *et al.* Labeling and survival studies on rabbit RBC [ J ]. *Chinese Journal of Applied Physiology*, 2003, 19 ( 4 ) : 410 - 412. [ 任素萍, 马恩普, 刘秀珍, 等. 兔红细胞的荧光标记及寿命检测法. *中国应用生理学杂志*, 2003, 19 ( 4 ) : 410 - 412. ]
- [ 22 ] Weingart C L, Broitman-Maduro G, Dean G, *et al.* Fluorescent labels influence phagocytosis of *Bordetella pertussis* by human neutrophils [ J ]. *Infection and Immunity*, 1999, 67 ( 8 ) : 4264 - 4267.
- [ 23 ] Zhang C, Song X J, Wang J, *et al.* Stability and fluorescence spectra of lipase labeled with FITC [ J ]. *Chinese Journal of Applied Chemistry*, 2008, 25 ( 12 ) : 1381 - 1384. [ 张驰, 宋锡瑾, 王杰, 等. FITC 标记脂肪酶的稳定性和荧光光谱. *应用化学*, 2008, 25 ( 12 ) : 1381 - 1384. ]

## Optimizing conditions of fluorescein isothiocyanate labeled *Vibrio anguillarum* and the effect of application condition on fluorescence signal

WANG Rui<sup>1,2</sup>, WANG Xiuhua<sup>2\*</sup>, WANG Yujuan<sup>2</sup>, HAN Wen<sup>2</sup>, HUANG Jie<sup>2</sup>

(1. College of Marine Life Science, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China)

**Abstract:** In order to track the target bacteria effectively, fluorescein isothiocyanate (FITC) was used as the marker to study the effect of labeling concentrations (0, 2, 2, 20, 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and time (1, 15, 30, 60, 120, 240 min) on the fluorescence intensity of *V. anguillarum* labeled FITC. In the meanwhile, the stability of fluorescence labeled on *V. anguillarum* stored at different temperatures (25, 4, -20, -70  $^{\circ}\text{C}$ ) and different time (24, 48, 96, 192 h) were compared. The possible change of fluorescence intensity was monitored when *V. anguillarum* labeled FITC was inactivated by formaldehyde. Also the fluorescence quenching effects of different intensity natural light (0, 150, 1 500, 25 000 lx) indoors and the effects of repeated freezing and thawing at -20 and -70  $^{\circ}\text{C}$  on *V. anguillarum* labeled FITC were analyzed. The results showed that the optimal concentration of FITC was in the range of 20 to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and the optimal time was in the range of 60 to 120 min. The fluorescent signal from *V. anguillarum* labeled FITC was more stable when it was stored at -20 and -70  $^{\circ}\text{C}$  than those stored at 4 and 25  $^{\circ}\text{C}$ . The stability of fluorescent signal from formaldehyde inactivated *V. anguillarum* labeled FITC was better than that from the control, and no difference was found in the quenching effect in different intensity of natural lighting. After 3 times of freezing and thawing, the fluorescent signal from *V. anguillarum* labeled FITC frozen at -70  $^{\circ}\text{C}$  was more stable. The results above provided useful technical parameters when FITC was used as a marker to label the marine bacteria.

**Key words:** *Vibrio anguillarum*; fluorescein isothiocyanate; fluorescence labeling; labeling conditions

**Corresponding author:** WANG Xiuhua. E-mail: wangxh@ysfri.ac.cn