

FDA-PI 双色荧光法检测蓝藻细胞活性的研究*

湛丽斌^{1,2} 梁文艳^{1,2} 曲久辉^{※*} 解明曙² 雷鹏举¹ 刘会娟¹

(1 中国科学院生态环境研究中心, 环境水质学国家重点实验室, 北京, 100085 2 北京林业大学资源与环境学院, 北京, 100083)

摘 要 对 FDA-PI 双色荧光法检测水华鱼腥藻和铜绿微囊藻的活性进行了研究, 用荧光显微镜对染色结果进行测定. 结果表明, 在蓝色光激发下 (495nm), 活细胞被双醋酸荧光素 FDA 染成亮绿色, 死亡细胞被碘化丙啶 PI 染成红色. 染色效率与原植体类型和细胞密度有关. 对细胞密度为 $6 \times 10^7 - 7 \times 10^9$ 个 $\cdot \Gamma^{-1}$ 的铜绿微囊藻, FDA 染色效率可达 94% 以上. 对细胞密度为 $4 \times 10^7 - 5 \times 10^8$ 个 $\cdot \Gamma^{-1}$ 的水华鱼腥藻, FDA 染色效率可达 91% 以上, 但细胞密度增大到 5×10^9 个 $\cdot \Gamma^{-1}$ 时, 由于藻丝体易卷曲在一起, FDA 染色率下降到 67%. 对死亡细胞, PI 染色率基本都可达到 100%. 因此, 用 FDA-PI 检测活细胞和死亡细胞混合的细胞悬液, 可根据细胞所发出的不同荧光而判断细胞活性.

关键词 蓝藻细胞, 活性, 荧光染色, 双醋酸荧光素, 碘化丙啶.

在水处理过程中, 通过测定含藻水中溶解氧的变化, 可以间接地判断藻细胞的存活状态^[1], 采用细胞培养法, 在一定时间后测定细胞密度也可以进行活性评价^[2]. 但这些方法都需要进行藻的培养, 消耗的时间较长, 而且不能直接对细胞活性状态进行判别.

在细胞活性鉴定方面, 传统的方法是使用台盼蓝染色法. 虽然台盼蓝染色法操作简单, 但细胞计数时间不能太长, 否则染料易进入活细胞中, 影响计数的准确性. 荧光染色 (荧光标记) 是检测细胞活性常用的方法^[3]. Regei 等人曾用 FDA (双醋酸荧光素, Sigma) 单染色法对铜绿微囊藻和月牙藻的活性进行检测^[4]. FDA-PI (碘化丙啶, Sigma) 双色荧光法是 Jones 等人第一次在动物细胞活性鉴定方面提出的方法, 与常规的台盼蓝相比, 该方法具有较好的稳定性, 如果细胞重悬在小牛血清中, 染色后样品可保存 1 个星期^[5]. 对染色后的样品, 检测手段可以采用荧光显微镜进行图像观察和计数^[5], 用荧光分光光度计测定细胞活性的强弱和生物量^[6-7], 或采用流式细胞法测定细胞数量和生物量^[3-4]. 对于铜绿微囊藻这样外形比较规则的单细胞, 使用流式细胞仪能方便的测定细胞活性, 但对于呈链状的水华鱼腥藻, 由于其外形不规则, 很难用该方法进行测定. 因此, 用荧光显微镜作为检测手段, 虽然速度较慢, 但仍是一种比较可靠的方法.

本文对 FDA-PI 双色荧光法检测藻细胞活性进行了研究, 为水处理中测定藻细胞活性提供了一种新的途径.

1 材料和方法

1.1 藻细胞的培养

藻种为水华鱼腥藻 (*Anabaena flos-aquae* Kütz AF, FACHB245) 和铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa* Kütz MA, FACHB496), 属于蓝藻门, 购自中国科学院水生生物研究所. 水华鱼腥藻为丝状体, 由椭圆形或球形细胞连接而成. 实验室传代培养的铜绿微囊藻为分散的球形、类椭圆形单个细胞, 直径 3—7 μm . 水华鱼腥藻接种于 SE 培养基中, 铜绿微囊藻接种于 MA 培养基中, 于 30℃, 2000 Lux 和 14:10 (L:D) 光暗周期的条件下培养; 待进入对数增长期, 开始实验.

1.2 细胞悬液的配制

在 10mL 藻细胞液中加入 1mL 鲁哥氏溶液^[8], 于黑暗中放置 48h, 使细胞固定. 固定后的细胞已全部失去活性, 但细胞个体没有破碎分解. 固定后的藻细胞液在 3000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 转速下离心, 用培养

2004 年 12 月 3 日收稿.

* 国家自然科学基金 (50478115), 国家自然科学基金重点基金 (20337020). ** 联系人 E-mail jhq@mail.jcees.ac.cn

基重悬 3—4次,直到将鲁哥氏溶液清洗干净,溶液变成无色.重悬后的细胞作为死亡细胞染色检测.将活细胞与死细胞按比例配制成含活细胞 50%的细胞悬液,用于 FDA-PI双重荧光染色.

1.3 染料的配制与染色

将 FDA溶于丙酮中,配成浓度为 $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,置于 4℃冰箱中保存.染色时将 FDA加入到藻细胞液中,使其终浓度为 $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.PI用 DPBS缓冲溶液 (Dulbecco's phosphate buffered saline Hyclone)配成浓度为 $400\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 溶液,置于 4℃冰箱中保存,染色时终浓度为 $60\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

1.4 荧光显微镜检测

取处于对数增长期的藻细胞液,离心浓缩,配制成含不同活细胞密度的溶液,加入 FDA,在室温黑暗处放置 5min 取固定后的藻细胞液,用培养基配制成含不同死细胞密度的溶液,加入 PI 也在室温下放置 5min 取活细胞与死亡细胞混合的细胞悬液,先加入 FDA,振荡混合均匀后加入 PI 放置 5min 用荧光显微镜 (Nikon Diaphot 30Q 日本)进行检测. FDA 最大激发光波长为 493nm,发射光波长为 510nm,PI最大激发光波长为 540nm,发射光波长为 625nm.在蓝色光下 (最大激发波长 495nm),活细胞被 FDA 染成亮绿色,死细胞被 PI染成红色,用 Nikon相机拍下染色状况.

1.5 细胞计数和染色效率

藻细胞密度采用 0.1mL浮游植物计数板进行计数,计算公式如下:

$$N=\frac{A}{B\times C}\cdot\frac{D}{E}\cdot F$$

式中, N : 每升水样中藻细胞的个数, A : 计数框面积 (mm^2), B : 一个视野的面积 (mm^2), C : 计数时的视野数 (个), D : 1升水浓缩后体积 (mL), E : 计数框的容积 (mL), F 每片所测藻类数.

对 FDA和 PI单染色的细胞,根据明场下细胞的数量,以及荧光场下细胞数量,计算细胞的染色效率.

2 结果与讨论

2.1 FDA 荧光染色

当活性细胞具有完整细胞膜时, FDA 水解的荧光素不断在细胞内积累,使细胞在蓝色光下发出绿色荧光.当细胞膜受损,荧光素无法在细胞内累积,而使细胞无法发出荧光.活性高的细胞发出强烈的绿色荧光,活性弱的细胞发光较弱.图 1分别为水华鱼腥藻和铜绿微囊藻在荧光场下的照片,由图 1可以看出,荧光物质充满整个细胞,使细胞发出亮绿色.根据所发出的荧光,不仅可以计算细胞数量,而且可以非常清楚地辨别细胞形状.

表 1为水华鱼腥藻和铜绿微囊藻的单染色效率,从实验结果看,不同细胞密度的染色效率有所不同.水华鱼腥藻表现比较明显,细胞密度在 $4\times 10^7\text{个}\cdot\text{L}^{-1}$ — $5\times 10^8\text{个}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,染色效率在 91%—98%之间,细胞几乎都被染上,当细胞密度增大到 $5\times 10^9\text{个}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,水华鱼腥藻的染色效率下降较大,只有 67%.而对铜绿微囊藻,当细胞密度达到 $10^9\text{个}\cdot\text{L}^{-1}$ 数量级,染色效率仍能 达到 99%,在 $6\times 10^7\text{个}\cdot\text{L}^{-1}$ — $7\times 10^9\text{个}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内,细胞密度对染色效率的影响不大,这与 Jones等人在动物细胞实验时 $5\times 10^9\text{个}\cdot\text{L}^{-1}$ 下的效果一致^[5].细胞密度大时,水华鱼腥藻染色效率低的原因可能与原植体形状(细胞连接形态)有关,本实验所用的铜绿微囊藻呈分散的单细胞状态, FDA 比较容易进入细胞内,而水华鱼腥藻呈丝状,细胞链较长时,易卷曲在一起,影响 FDA进入细胞内,使染色效率下降.

表 1 FDA 和 PI对水华鱼腥藻和铜绿微囊藻的单染色效率
Table 1 The staining rate ofFDA and PI to*Anabaena flos-aquae* and *Microcystis aeruginosa*

细胞密度 /个·L ⁻¹	水华鱼腥藻			铜绿微囊藻		
	4×10 ⁷	5×10 ⁸	5×10 ⁹	6×10 ⁷	7×10 ⁸	7×10 ⁹
FDA 染色效率 /%	98±4.1	91±6.2	67±12	94±4.1	96±2.4	99±1.5
PI染色效率 /%	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0	100±0

注: 染色效率的结果为三组实验的 $\bar{x}\pm\text{SD}$.

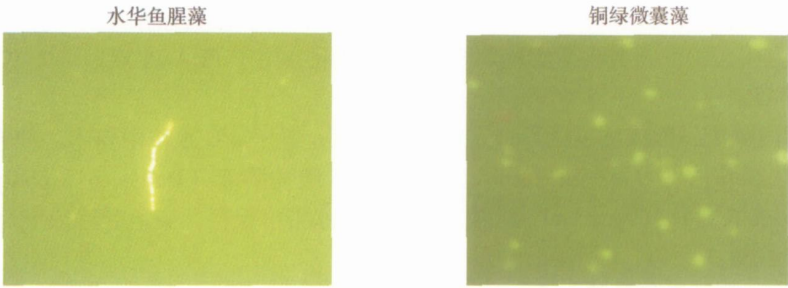


图 1 水华鱼腥藻和铜绿微囊藻 FDA 单染色状况

Fig 1 Epifluorescence micrographs of *A. flos-aquae* filament and single-celled *M. aeruginosa* stained by FDA

2.2 PI 荧光染色

PI 性质与 FDA 不同, 当细胞膜完好时, 它不能进入细胞内, 当细胞凋亡或死亡后, 因为细胞膜缺损而进入细胞. PI 与细胞内 DNA 和 RNA 物质相作用生成红色荧光物, 使死亡细胞发出红色荧光. 图 2 分别为水华鱼腥藻与铜绿微囊藻的 PI 染色状况. 在蓝光下, 死亡的细胞被 PI 染成红色.

从实验结果看 (表 1), PI 比 FDA 染色效率高, 但细胞所发出的红光却较弱, 呈暗红色, 荧光强度明显弱于 FDA, 实验反复多次, 仍如此. 这与有关文献中所述 PI 发出亮红色不太一致.

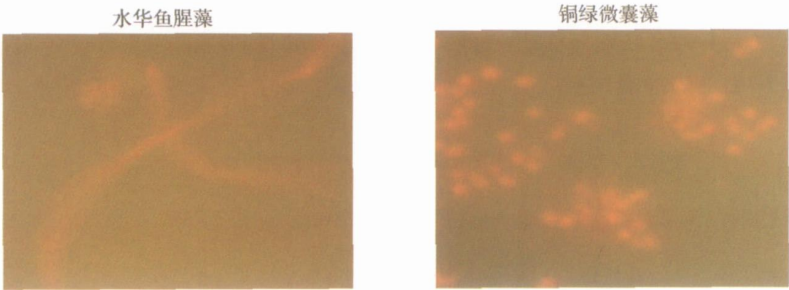


图 2 水华鱼腥藻、铜绿微囊藻 PI 单染色状况

Fig 2 Epifluorescence micrographs of *A. flos-aquae* filament and single-celled *M. aeruginosa* stained by PI

2.3 FDA-PI 双重荧光染色

将 5×10^9 个 $\cdot \Gamma^{-1}$ 和 7×10^9 个 $\cdot \Gamma^{-1}$ 的水华鱼腥藻和铜绿微囊藻细胞固定后, 分别与其活细胞溶液按 1:1 配成细胞悬液, 活细胞占 50%, 死亡细胞占 50%. 用 FDA-PI 进行双重荧光染色. 从图 3 可以看出, 活细胞被染成亮绿色, 而死亡细胞被染成红色. 在荧光显微镜下, 绿色和红色区别清晰, 说明用 FDA-PI 双重荧光染色, 可以对细胞活性进行判断, 发绿光的为活细胞, 而发红光的为死亡细胞.

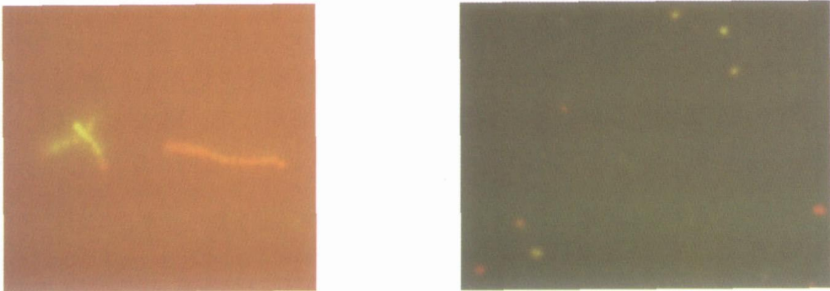


图 3 水华鱼腥藻、铜绿微囊藻 FDA-PI 双重染色状况

Fig 3 Epifluorescence micrographs of *A. flos-aquae* filaments and single-celled *M. aeruginosa* stained by FDA-PI double fluorescent dyes

3 结论

用 FDA 检测细胞的活性, 实际是对细胞膜完整性和细胞内酶活性的检测, 细胞膜完整性通常与细胞活性相关, 因此, 可以用 FDA 来检测细胞活性. 在水处理过程中, 如果出现藻细胞膜完好, 在胞内酶失去活性的状况下, 细胞有可能不被 FDA 或 PI 染色, 表现为不发荧光, 对这种情况下藻细胞活性的判断还需要进一步的研究.

参 考 文 献

[1] 吴星五, 高延耀, 李国建, 电化学法水处理新技术——杀菌灭藻. 环境科学学报, 2000 20 (增刊): 75—79

[2] Canavate J P, Lubin L M, Some Aspects on the Cryopreservation of Microalgae Used as Food for Marine Species. *Aquaculture*, 1995 136: 277—290

[3] Veal D A, Deere D, Ferrari B et al., Fluorescence Staining and Flow Cytometry for Monitoring Microbial Cells. *Journal Immunological Methods*, 2000 243: 191—210

[4] Regel R H, Ferris J M, Ganf G G et al., Algal Esterase Activity as a Biom measure of Environmental Degradation in a Freshwater Creek. *Aquatic Toxicology*, 2002 59: 209—223

[5] Jones K H, Senet J A, An Improved Method to Determine Cell Viability by Simultaneous Staining with Fluorescein Diacetate Propidium Iodide. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 1985 33 (1): 77—79

[6] Amano T, Hirasawa K, O'Donoghue M J et al., A Versatile Assay for the Accurate, Time-resolved Determination of Cellular Viability. *Analytical Biochemistry*, 2003 314: 1—7

[7] 祁爱群, 钱凯先, 邵健忠等, FDA-PI 双色荧光分光光度法检测细胞活性变化. 细胞生物学杂志, 2000 22 (1): 50—52

[8] 林碧琴, 姜彬慧, 藻类与环境保护. 沈阳: 沈阳民族出版, 1999 573

THE VIABILITY DETERMINATION OF CYANOBACTERIA
BY DOUBLE STAINING WITH FLUORESCEN
DIACETATE AND PROPIDIUM IODIDE

CHEN Lixin^{1, 2} LIANG Wenyan^{1, 2} QU Jiu-hui¹
XIE Ming-shu² LEI Peng-jie¹ LIU Hui-juan¹

(1 State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Research

Center for Eco-Environmental Science, Chinese Academy of Science, Beijing 100085

2 College of Natural Resources & Environment, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

ABSTRACT

The paper studied the viability determination of two kinds of algae *Anabaena flos-aquae* and *Microcystis aeruginosa* by FDA-PI double staining. Fluorescence emission from cells was measured by fluorescence microscopy. The results indicated that viable and dead cells were stained as bright green and red fluorescent cells respectively by fluorescein diacetate and propidium iodide under blue excitation (495nm). The staining rate has relation with the cell density. If the cell density of *Anabaena flos-aquae* and *Microcystis aeruginosa* was $6 \times 10^7 - 7 \times 10^9 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$ and $4 \times 10^7 - 5 \times 10^8 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$, the FDA staining rate would be more than 94% and 91%. But if the cell density of *Anabaena flos-aquae* increased to $5 \times 10^9 \text{ cells} \cdot \text{L}^{-1}$, the staining rate would fall to 67% obviously due to cell twisting together. The staining rate of PI can reach 100% for the two kinds of algae. Based on the fluorescent light from cells, it can be easy to determine the cell viability. FDA-PI double staining method is a new method to measure the algae cell viability.

Keywords cyanobacteria, viability, fluorescence staining, fluorescein diacetate, propidium iodide