

# 运用双特异分子探针技术 对胶州湾三种硅藻的检测\*

甄毓<sup>1</sup> 于志刚<sup>2</sup> 蔡青松<sup>3</sup> 米铁柱<sup>1</sup> 李荣秀<sup>3</sup>

(1.中国海洋大学海洋环境与生态教育部重点实验室 青岛 266100; 2.中国海洋大学海洋化学理论与工程技术教育部重点实验室 青岛 266100; 3.上海交通大学生命科学与技术学院 上海 200030)

**提要** 利用本实验室首创的双特异分子探针技术对胶州湾常见的 3 种硅藻-旋链角毛藻 (*Chaetoceros curvisetus* Cleve)、尖刺拟菱形藻 (*Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex Cleve) Halse) 和中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum* (Greville) Cleve) 进行定性与定量分析。结果表明, 无论是对实验室样品还是自然样品进行检测, 本技术均有较好的适用性, 对 3 种目标藻的最低检测细胞数分别为  $4.2 \times 10^4$ 、 $9.4 \times 10^3$  和  $6.0 \times 10^4$  个细胞。统计分析表明, 双特异分子探针技术对 3 种目标藻的分析结果与经典的显微镜镜检结果没有显著性差异。本技术利用了多孔酶标板进行检测, 整个实验过程约 7 h, 可在较短时间内分析大量样品中的多种微藻, 为同时监测多种赤潮藻开辟了一条新途径。

**关键词** 胶州湾, 旋链角毛藻, 尖刺拟菱形藻, 中肋骨条藻, 双特异分子探针技术

**中图分类号** X172

胶州湾位于我国山东半岛南部, 是一个半封闭的海湾, 也是我国北方最重要的港口与水产养殖水域之一。近年来, 胶州湾赤潮频发带来的影响已经日益引起广泛的重视 (霍文毅等, 2001; 韩笑天等, 2004), 因此监测浮游植物种群结构和动态变化对胶州湾的生态研究, 特别是赤潮防治具有重要意义。

胶州湾的优势浮游植物种类主要包括旋链角毛藻 (*Chaetoceros curvisetus* Cleve)、尖刺拟菱形藻 (*Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex Cleve) Halse)、中肋骨条藻 (*Skeletonema costatum* (Greville) Cleve)、布氏双尾藻 (*Ditylum brightwellii* (West) Grunow ex Van Heurck)、菱形海线藻 (*Thalassionema nitzschioides* (Grunow) Van Heurck)、夜光藻 (*Noctiluca scintillans* (Macartney) Kofoid & Swezy)、三角角藻 (*Ceratium tripos* (O. F. Müller) Nitzsch)和梭角藻 (*C. fusus* (Ehrenberg) Dujardin)等。其中, 旋链角毛藻、尖刺拟菱形藻和中肋骨条藻是胶州湾中数量最多的

硅藻, 它们都有形成赤潮的记录 (Zou *et al.*, 1993; 霍文毅等, 2001; 齐雨藻等, 2003)。所以, 监测这些硅藻优势藻种的种群动态和演替对深入了解胶州湾生态系统结构具有十分重要的意义。

对微藻种类和数量进行识别的传统方法是以形态学为基础的光学或电子显微镜观察, 这种方法是非常有效的, 在藻类研究中一直发挥着重要作用。然而, 传统方法对于分析长期观察获得的大量样品或一次大规模采样获得的样品来说是非常耗时耗力的 (Scholin *et al.*, 1996b)。所以, 越来越多的新方法正被引入这个领域以解决这一难题, 其中除了基于形态学分析的自动影像分析技术外 (Sieracki *et al.*, 1998), 基于藻类色素分析的化学分类学方法 (姚鹏等, 2003)、现场荧光检测法 (Koehne *et al.*, 1999), 基于分子探针技术的寡核苷酸探针 (Scholin *et al.*, 1996a; 梁君荣等, 2005)和免疫测定方法 (Xin *et al.*, 2004)以及基于流式细胞术的检测方法 (Jonker *et al.*, 1995)等

\* 国家十五 863 计划资源与环境领域海洋监测主题资助项目, 2001AA635090 号和国家自然科学基金资助项目, 40406028 号。  
甄毓, 博士, E-mail: zhenyu@ouc.edu.cn

通讯作者: 于志刚, E-mail: zhigangyu@ouc.edu.cn

收稿日期: 2008-10-05, 收修改稿日期: 2009-04-14

技术都在藻类的鉴定和监测中发挥着越来越重要的作用(米铁柱等, 2003)。其中, 分子探针技术由于具有特异性和灵敏性高及易于实现自动化等特点, 在对藻类的监测中有着很大的应用和推广潜力。目前, 一种基于分子探针技术的新方法 - 双特异分子探针技术在浮游植物的种类鉴定和数量分析方面已经取得了成功(Cai *et al*, 2006)。

双特异分子探针技术利用 S1 酶能够保护完全匹配的双链核酸的性质, 将目标生物的 rRNA 转化为等量的互补 DNA 探针。这样既利用了 rRNA 高拷贝量的优点, 又克服了 rRNA 不稳定、特异性不好的缺点。本方法已经在检测微小原甲藻 (*Prorocentrum minimum*)和海洋原甲藻 (*P. micans*)的试验中取得了成功(Cai *et al*, 2006)。在本研究中, 作者也采用本技术对胶州湾中的硅藻优势种旋链角毛藻、尖刺拟菱形藻和中肋骨条藻进行分析, 希望该技术能在对这些优势种的监测中发挥作用。

## 1 仪器与设备及材料和方法

### 1.1 主要仪器与设备

光照培养箱、台式冷冻高速离心机、电热恒温水槽、PCR 仪、电泳仪、恒温摇床、酶标仪和洗板机等。

### 1.2 藻种培养

旋链角毛藻(株系号: SMHX210)、尖刺拟菱形藻(株系号: SMHX215)、中肋骨条藻(株系号: SMHX213)和其它试验藻种均来源于中国海洋大学海洋生命学院浮游植物分类与生态实验室(三种目标藻的光学显微镜图谱如图 1)。培养在 *f/2* 培养基中进行(Guillard *et al*, 1962), 以普通日光灯为光源, 光照强度及光照周期分别为  $60 \mu\text{E}/(\text{m}^2 \cdot \text{S}^{-1})$ 和 12 h:12 h; 培养温度为 22—25℃。

### 1.3 目标藻 RNA 的提取

目标藻 RNA 提取按照 Venugopalan 等(1997)的方

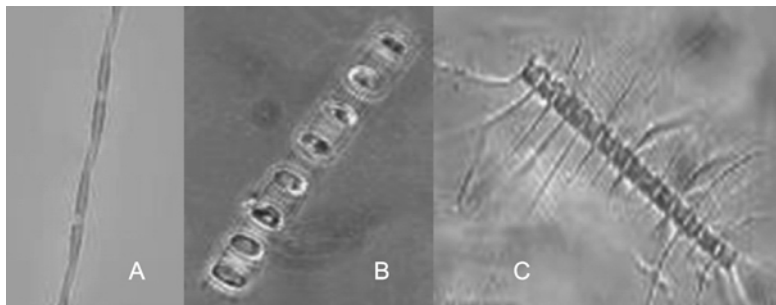


图 1 三种微藻的光学显微镜图谱

Fig.1 The microscopic pictures of three microalgae  
A. 尖刺拟菱形藻; B. 中肋骨条藻; C. 旋链角毛藻

法改进而来。首先离心收集处于指数生长期的藻细胞到 1.5 ml 离心管中, 加入 100  $\mu\text{l}$  变性溶剂 [4 mol/L 异硫氰酸胍, 25 mmol/L 柠檬酸钠, 0.5 % 十二烷基肌氨酸钠 (Sarcosyl), 100 mmol/L 巯基乙醇], 用组织捣碎棒研磨样品后, 加入 400  $\mu\text{l}$  变性溶剂, 用注射器反复吹打 7—8 次; 接着加入 500  $\mu\text{l}$  酸性酚, 100  $\mu\text{l}$  氯仿/异戊醇 (49 : 1), 50  $\mu\text{l}$  乙酸钠 (2 mol/L, pH 4.0), 震荡混匀; 冰浴 15 min 后, 4℃, 12000 r/min 离心 10 min; 将上清液转移到另一新离心管, 加入等体积的异丙醇, -20℃ 静置过夜; 4℃, 12000 r/min 离心 10 min, 除去上清液后用 75%乙醇清洗沉淀两次, 室温晾干。最后用焦碳酸二乙酯 (DEPC)处理过的双蒸水溶解沉淀, -80℃ 保存备用。

### 1.4 引物设计

从 GenBank 中获得旋链角毛藻、尖刺拟菱形藻和中肋骨条藻的核糖体 RNA 大、小亚基基因序列 (LSU rRNA, SSU rRNA) 信息, 通过 Blastn 在 GenBank 中搜索同源序列。根据搜索结果, 选择最保守的区域用 Primer Premier 软件分别针对核糖体 RNA 大、小亚基作引物设计 (图 2 和表 1)

### 1.5 RT-PCR 扩增、克隆和测序

所有的 RT-PCR 反应应用 One Step RT-PCR 试剂盒 (Takara, 大连宝生物)来完成。反应体系如表 2, 优化后的 RT-PCR 反应程序为: 50℃ 30 min, 94℃ 2 min; 接着在 94℃ 变性 30 s, 51℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 1 min 30 s, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 7 min。取 5  $\mu\text{l}$  RT-PCR 产物于 1.0%琼脂糖凝胶上电泳并割胶回收目标片段, 连接到 pMD18-T 载体 (Takara, 大连宝生物), 并转化感受态 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 用蓝白斑法筛选重组子, 双酶切鉴定阳性克隆。选取经鉴定的阳性克隆, 送交测序公司测序(上海生工生物工程技术服务有限公司)。测序引物为 M13/pUC Sequencing Primer (-20) 和 M13/pUC Reverse Sequencing Primer (-48)。

### 1.6 探针的设计与合成

将获得的旋链角毛藻、尖刺拟菱形藻和中肋骨条藻的测序结果进行 Blastn 分析, 以确定其 rRNA 序列与 GenBank 中相应藻种的序列相符, 从而进一步证明本研究采用的藻种的准确性。在 Blastn 结果中找出与其他藻种 (主要在同属不同种之间)的 rRNA 序列差别大的区域, 然后根据该区域设计 NPA 探针; 将获得的 NPA 探

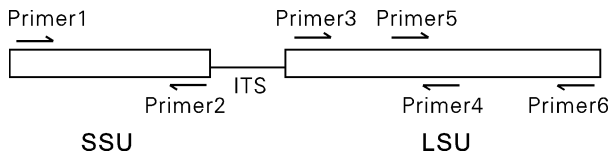


图2 引物示意图

Fig.2 The primer positions

注: 引物 1 (Primer1)和引物 2 (Primer2)位于核糖体 RNA 小亚基部分 (SSU rRNA), PCR 产物约 900 bp; 引物 3 (Primer3)、引物 4 (Primer4)、引物 5 (Primer5)和引物 6 (Primer6)位于核糖体 RNA 大亚基部分 (LSU rRNA), PCR 产物约 900 bp 和 1300 bp

针再一次进行 Blastn 分析, 确认其特异性; 接着再根据 NPA 探针序列设计相应的捕获探针和连接探针序列, 最后送上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.7 双特异分子探针技术

双特异分子探针技术利用了 S1 酶的特性, 这种酶是单链特异性的核酸内切酶, 能将单链 DNA 或 RNA 降解成为可溶性 5'P 核苷酸, 而保持双链 DNA、RNA 或 DNA/RNA 杂合体的完整性。整个检测分为几个步骤: 首先, S1 酶保护分析探针 (NPA 探针)与细胞裂解液中的 rRNA 形成 DNA/RNA 杂合体, S1 酶消化除去未匹配或者不完全匹配的 NPA 探针和

rRNA; 接着通过高温变性, 与目标 rRNA 完全匹配的 NPA 探针被释放出来并被转移到预先包被有相应捕获探针的酶标板上进行杂交, 相应的连接探针与被固定的 NPA 探针杂交, 通用信号探针再与连接探针杂交; 最后, 辣根过氧化物酶标记的抗体与通用信号探针反应, 再加入显色底物即可获得检测信号。信号大小与样品中目标藻种的密度具有一定的相关关系 (图 3) (Cai *et al.*, 2006)。

1.7.1 捕获探针的固定 在预先包被有亲和素的酶标板 (Reacti-Bind™ Streptavidin High Binding Capacity Coated Plates, Pierce)的每孔中加入 100 μl 5 nmol/L 捕获探针, 37℃静置 2 h。用 PBS (pH 7.2) 洗三次备用。

1.7.2 样品的采集和细胞裂解 取处于稳定生长期的藻细胞液 4 ml, 其中 2 ml 用 2%福尔马林固定后用浮游植物计数框计数 (Guillard, 1973), 2 ml 离心收集在 1.5 ml 离心管中, 加入含有 50 nmol/L S1 酶保护分析探针的 1 ml 裂解液 (80% 甲酰胺, 450 mmol/L 氯化钠, 5 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠, 1% SDS; pH 6.4); 在 50% duty cycle, 450 W 条件下超声波破碎细胞处理 4 min 后 (超声波细胞破碎仪, JY-92 II, 宁波科生仪器厂), 真空过滤收集细胞裂解液于离心管中。

表1 本文所设计的引物及序列

Tab.1 Primers used in this study

引物名称	序列 Sequences 5' 3'	长度 (nt)	目标区域
Primer1	ACC TGG TTG ATC CTG CCA GT	20	SSU rRNA
Primer2	TCA CCT ACG GAA ACC TTG T	19	SSU rRNA
Primer3	CGG AGG AAA AGA AAC TAA C	19	LSU rRNA
Primer4	AGC TAC TAG ATG GTT CGA T	19	LSU rRNA
Primer5	GCG AAA GAC TAA TCG AAC	18	LSU rRNA
Primer6	ACT TTG ACA TTC AGA GCA C	19	LSU rRNA

表2 逆转录 PCR 反应体系

Tab.2 The one-step RT-PCR kit

反应体系中的成分	体积 (μl)
10×One Step RNA PCR buffer	5
25 mmol/L MgCl <sub>2</sub>	10
10 mmol/L dNTP	5
上游引物 (P1, P3 或 P5)	1
下游引物 (P2, P4 或 P6)	1
AMV-Optimized Taq	1
AMV-RTase X (5 U/μl)	1
经 DNA 酶处理过的 RNA 样品	1
RNase free ddH <sub>2</sub> O	25

1.7.3 S1 酶保护分析 在上述裂解液中加入 200 μl 液体石蜡, 95℃处理 15 min, 然后于 42℃杂交 2 h; 取 30 μl 杂交液自然冷却后加入 30 μl 含有 40 U S1 酶 (Promega) 的缓冲液 (22.5 mmol/L 硫酸锌, 250 mmol/L 乙酸钠, 1.4 mol/L 氯化钠; pH4.5), 42℃处理 1 h; 加入 150 μl 终止缓冲液 (30 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 350 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 150 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 95℃处理 15 min, 自然冷却后用于夹心杂交。

1.7.4 夹心杂交 从获得的 210 μl 上述反应混合液中移取 100 μl 加入到固定有捕获探针的酶标板中, 在恒温摇床中杂交 1 h (50℃, 200 r/min), 然后用含有

0.5 % Tween-20 的 PBS 洗涤 5 次; 接着每孔加入含有 100  $\mu$ l 5 nmol/L 连接探针的杂交缓冲液 (4  $\times$  SSC, 10% formamide, 0.02 % SDS; pH 7.2), 在 50 $^{\circ}$ C 和 200 r/min 下杂交 30 min, 用含有 0.5 % Tween-20 的 PBS 洗涤 5 次; 然后每孔加入含有 100  $\mu$ l 5 nmol/L 通用信号探针的杂交缓冲液 (4  $\times$  SSC, 10% Formamide, 0.02% SDS; pH 7.2) 在 50 $^{\circ}$ C 和 200 r/min 下杂交 30 min, 用含有 0.5 % Tween-20 的 PBS 洗涤 5 次; 每孔加入 100  $\mu$ l 辣根过氧化物酶标记的抗荧光素抗体 (Roche), 37 $^{\circ}$ C 孵育 20 min, 然后用含有 0.5 % Tween-20 的 PBS 洗 6 次; 最后每孔加入 100  $\mu$ l TMB 显色液 (1

mM TMB, 200 mmol/L 柠檬酸钾, 3 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; pH 4.0), 37 $^{\circ}$ C 处理 15 min 后, 每孔加入 50  $\mu$ l 2 mol/L 硫酸终止反应。在 450 nm 和 630 nm 用双波长检验法测定光吸收值 (ST-360 酶标仪, 上海科华生物工程股份有限公司), 得到  $OD_{450\text{ nm}}/OD_{630\text{ nm}}$

### 1.8 探针的特异性验证

按照 1.7.2 的方法收集和处理下列微藻样品: 塔玛亚历山大藻 (株系号: SMHX104)、裸甲藻 (株系号: SMHX101)、新月筒柱藻 (株系号: SMHX214)、红色裸甲藻 (株系号: SMHX103)、圆海链藻 (株系号: SMHX218)、诺氏海链藻 (株系号: SMHX216)、直链藻 (株系号: SMHX219)、旋链角毛藻 (株系号: SMHX210)、尖刺拟菱形藻 (株系号: SMHX215)、中肋骨条藻 (SMHX213)、锥状斯氏藻 (SMHX109)、棕囊藻 (SMHX421)、海洋原甲藻 (SMHX105)、微小原甲藻 (SMHX106) 和赤潮异弯藻 (SMHX320), 将获得的裂解液分别加入包被有旋链角毛藻、尖刺拟菱形藻和中肋骨条藻捕获探针的酶标板上, 按 1.7 进行双特异分子探针技术分析, 验证这三种藻的探针的特异性。

### 1.9 分析曲线的建立

收集一定量处于稳定生长状态的旋链角毛藻、尖

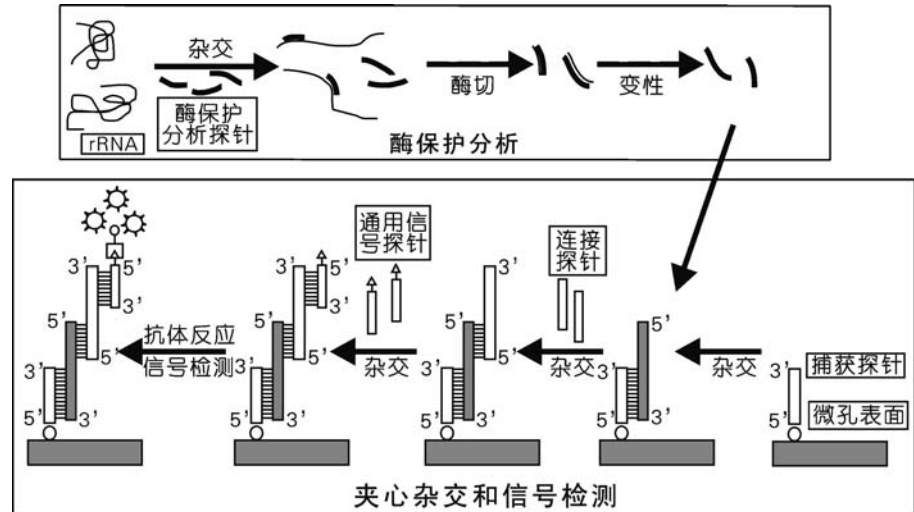


图 3 双特异分子探针技术的原理示意图

Fig.3 The sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay (NPA-SH) 包括如下步骤: (1) S1 酶保护分析探针与细胞裂解液中 rRNA 形成 DNA/RNA 杂合体; (2) S1 酶消化除去未匹配或者不完全匹配的 S1 酶保护分析探针和 rRNA; (3) 终止 S1 酶的消化反应, 并变性被保留下来的 DNA/RNA 杂合体; (4) 将该溶液转移到预先包被有相应的捕获探针的酶标板上, 进行杂交, S1 酶保护分析探针被固定到酶标板上; (5) 相应的连接探针与被固定的 S1 酶保护分析探针杂交; (6) 通用信号探针与连接探针进行杂交; (7) 辣根过氧化物酶标记的抗体与通用信号探针反应; (8) 加入发光底物或者显色底物获得可以检测的信号

刺拟菱形藻和中肋骨条藻的细胞进行裂解, 用含有相应 S1 酶保护分析探针的裂解缓冲液 2 倍梯度逐级稀释 5 次, 共获得 6 个样品。将每个藻种的一份样品按稀释方法平行处理 4 次, 用双特异分子探针技术进行分析。以双波长检验获得的光吸收值  $OD_{450\text{ nm}}/OD_{630\text{ nm}}$  对细胞数量作图得到分析曲线 (稀释曲线) 方程。

### 1.10 培养样品与现场样品分析

取一定量纯种旋链角毛藻、尖刺拟菱形藻和中肋骨条藻细胞培养液作为分析样品, 将每种样品分成 6 份, 3 份用双特异分子探针技术分析样品中目标藻数量, 3 份用显微镜观察计数目标藻数量。两种结果进行比较。

分别向含有  $6.0 \times 10^5$  个旋链角毛藻细胞、 $8.1 \times 10^4$  个尖刺拟菱形藻细胞、 $8.9 \times 10^5$  个中肋骨条藻细胞的样品中加入一定数量的多种其他藻培养物制成混合样品。将混合样品分成 6 份, 3 份用双特异分子探针技术分析样品中目标藻数量, 3 份用显微镜观察计数目标藻数量。考察两种分析方法的差别。

收集 1 L 采自青岛团岛国家海洋局北海分局码头的的环境样品, 采用双特异分子探针技术进行分析, 得到的光吸收值分别运用 3 种藻的分析曲线方程进行

计算, 获得样品中含有的各种藻细胞数, 与显微计数的结果进行比较。

## 2 结果

### 2.1 rRNA 序列分析和探针设计

每组目标藻检测探针包括 3 条寡核苷酸探针, 即 S1 酶保护分析探针 (NPA 探针)、捕获探针和连接探针。根据 Blastn 的分析结果, 分别针对旋链角毛藻、尖刺拟菱形藻和中肋骨条藻序列的特异区域设计出 NPA 探针。其中, 旋链角毛藻和中肋骨条藻的 NPA 探针分别针对核糖体 RNA 小亚基部分, 而尖刺拟菱形藻则针对核糖体 RNA 大亚基部分。NPA 探针长约 60 nt, GC 含量 40%—60%, 不含明显的二级结构, 该序列与核糖体 RNA 互补; 捕获探针长约 25 nt, 5' 端标记有生物素 (Biotin), 与 NPA 分析探针的 3' 末端互补。连接探针长约 60 nt, 5' 端有大约 25 nt 与 S1 酶保护分析探针 5' 端的互补, 3' 端与荧光素 (Fluorescein) 标记的通用信号探针互补。采用 Primer Premier 分析软件评估探针的参数, 使获得的探针参数基本保持一致 (表 3)。

### 2.2 探针特异性

旋链角毛藻、尖刺拟菱形藻和中肋骨条藻的探针都具有较高的特异性, 只有当被检测的藻种和相应探针相匹配时, 才产生显著信号 (图 4)。

### 2.3 分析曲线

将获得的光吸收值与收集的旋链角毛藻细胞总数作图, 可以得到一条标准的 S 型分析曲线 (图 5), 选取 S 形曲线的直线部分即可得到分析曲线, 该曲线

的线性范围为  $4.2 \times 10^4$ — $1.2 \times 10^6$  个细胞 (图 6)。按同样方法可以获得尖刺拟菱形藻和中肋骨条藻的分析曲线, 它们都具有较好的线性关系 (表 4)。

### 2.4 样品的检测及与显微镜计数比较

对纯种旋链角毛藻、尖刺拟菱形藻和中肋骨条藻细胞分别进行双特异分子探针技术检测和显微镜观察计数, 两种方法所得结果进行比较。统计分析表明, 它们没有显著性差异 ( $P < 0.05$ ) (表 5)。

对混合藻种分别进行双特异分子探针技术分析和显微镜观察计数, 计算两种方法的百分偏差。结果发现, 两种方法所得结果的百分偏差分别为 7.5%、10.8% 和 9.5% (图 7)。统计分析表明, 它们没有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。本结果说明其它藻类对目标藻的检测影响较小, 双特异分子探针技术具有较好的特异性。

用双特异分子探针技术对现场样品进行分析, 发现该样品中只有中肋骨条藻和旋链角毛藻, 分析结果与显微镜计数结果接近 (图 8)。对中肋骨条藻和旋链角毛藻进行检测的两种分析结果的相对百分偏差分别为 6.3% 和 11.4%; 显微镜观察还发现样品中有其它的未知细胞。

## 3 讨论

当前对浮游植物进行系统分析与定性定量检测的分子生物学方法主要包括以下几种: 抗体技术 (Xin *et al*, 2004)、荧光原位杂交技术 (梁君荣等; 张宝玉等, 2005)、PCR 技术 (张宝玉等, 2004; 张宝玉等, 2005; Galluzzi *et al*, 2004) 和 Scholin 等发展的夹

表 3 本文中相关探针序列  
Tab.3 Probes used in this study

藻名	探针名称	序列 5' 3'	长度 (nt)
旋链角毛藻	酶保护分析探针	taatgccaggacgaaccactcaaggatgccgcacaacatcgagtaccaccaaaaggtc	60
	捕获探针	<b>Biotin</b> -gaccttggtggtactcgtatgtg	25
	连接探针	cttgagtgttcctcctggcattataaacaactcacctgccgaatgaactagccctg	57
尖刺拟菱形藻	酶保护分析探针	ccacaagtggccagggaatatgaacaacaactggtttccttcgcttccgtttca	59
	捕获探针	<b>Biotin</b> -tgaaacggaagcgaagaaacc	22
	连接探针	catatttcctggccacttggttaacaactcacctgccgaatgaactagccctg	55
中肋骨条藻	酶保护分析探针	ccgtccgcagtttcgataaagtatcttatacttacatgcatggcttaactcttgagac	60
	捕获探针	<b>Biotin</b> -gtctcaaagattaagccatgatgtgt	27
	连接探针	agatactttatcgaaactcggacggtaacaactcacctgccgaatgaactagccctg	58
	通用信号探针	<b>Fluorescein</b> -cagggtagttcattcggcagtgagttgta	32

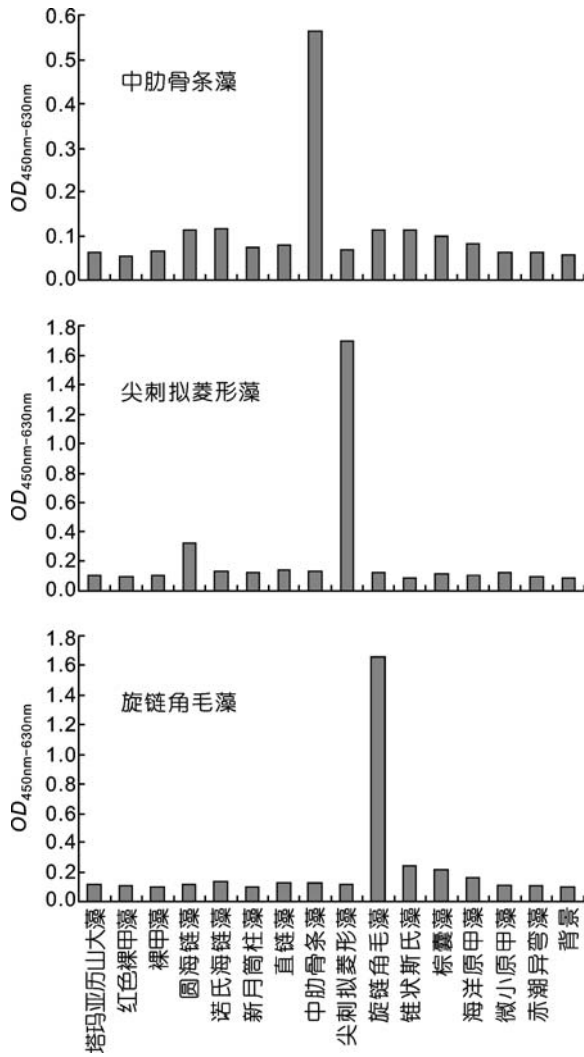


图 4 旋链角毛藻、尖刺拟菱形藻和中肋骨条藻探针的特异性

Fig.4 The specificity of probes for *Chaetoceros curvisetus*, *Pseudo-nitzschia pungens* and *Skeletonema costatum*

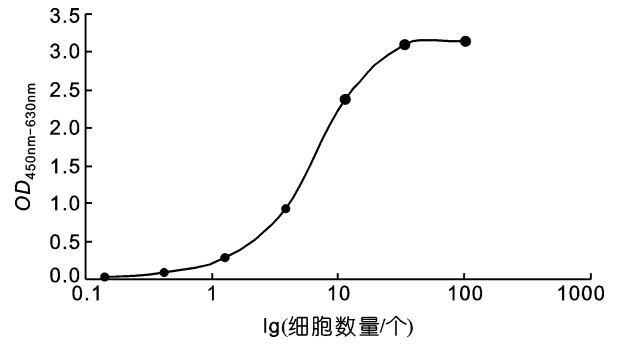


图 5 旋链角毛藻的 S 型分析曲线(x 轴为对数坐标)  
Fig.5 The S-shaped curve for *Chaetoceros curvisetus* in logarithmic x-axis.

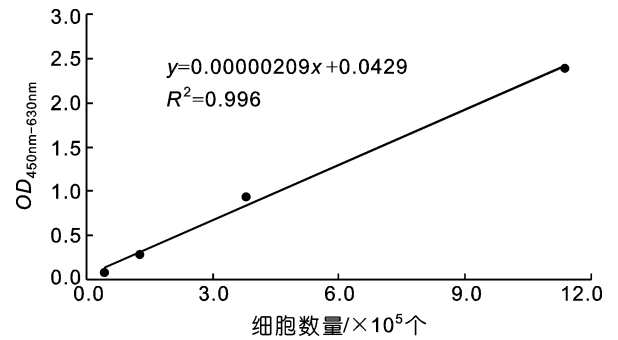


图 6 旋链角毛藻的分析曲线  
Fig.6 The linear curve for *Chaetoceros curvisetus*

心杂交技术 (Scholin *et al*, 1996a)。应用抗体技术检测浮游植物的制约因素在于制备高度专一性的抗体,特别是要实现同一种属的区分,需要制备针对各种藻的单克隆抗体。而制备单抗的方法往往需要杂交瘤细胞技术,实验复杂,成本高昂,严重制约了特异性抗体的开发。荧光原位杂交技术首先需要找到特异性高的探针和分析控制条件,在实际分析亲缘关系接

表 4 各种藻细胞的分析曲线方程和线性范围

Tab.4 The equations of linear regression and linear range for *Chaetoceros curvisetus*, *Pseudo-nitzschia pungens* and *Skeletonema costatum*

藻 名	分析曲线方程	线性范围	R <sup>2</sup>
旋链角毛藻	$y = 0.00000209x + 0.0429$	$4.2 \times 10^4 - 1.2 \times 10^6$	0.996
尖刺拟菱形藻	$y = 0.00000300x + 0.0867$	$9.4 \times 10^3 - 6.0 \times 10^5$	0.990
中肋骨条藻	$y = 0.00000159x + 0.1210$	$6.0 \times 10^4 - 1.0 \times 10^6$	0.991

注:表中 x 代表被收集进行分析的细胞数量; y 代表双波长检验获得的光吸收值  $OD_{450\text{ nm}}/OD_{630\text{ nm}}$

表 5 双特异分子探针技术与显微镜计数检测纯种培养藻细胞的结果比较

Tab.5 Comparison for cultured samples in quantitative results by NPA-SH and microscopic observation

藻名	显微镜计数细胞数(个)	双特异分子探针技术分析细胞数(个)
旋链角毛藻	73100 ± 4610	66500 ± 5920
尖刺拟菱形藻	11500 ± 426	12600 ± 819
中肋骨条藻	115000 ± 5830	108000 ± 5640

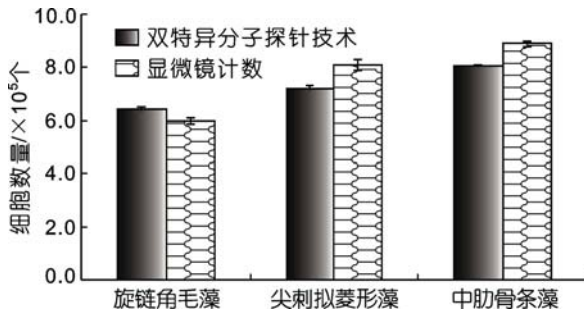


图7 双特异分子探针技术与显微镜计数检测混合样品中藻细胞的结果比较

Fig.7 Comparison for mixed samples in quantitative results by NPA-SH and microscopic observation

近的微藻时,不能凭借荧光信号的有无直接判断,还需要借助形态学的特征辅助判断,并未彻底解决准确性这个问题。实践经验证实,该技术的可重复性还需要大大的改进。如果结合流式细胞技术,该方法也可以用于特定浮游生物定量分析,但是由于浮游植物的形态体积变化大,很难做到对同一样本中的多个目标藻进行同时分析。PCR技术的最大问题在于需要样品DNA的高质量纯化,现有的技术对很多浮游生物的DNA纯化效率低,纯化效率在每次实验之间不稳定,有的甚至根本无法进行DNA纯化,这就在很大程度上影响了实际分析的准确性。另外,定量PCR技术对实验人员和实验控制的要求比较高,由于这些限制,对大规模采集的样品进行定量PCR分析很难实现,即使实现了其可信度也大打折扣。对rRNA直接进行操作的夹心杂交技术大大推动了分子生物学技术在赤潮微藻检测方面的应用,遗憾的是该技术经过近十年的发展,仅仅开发出为数很少的分析探针和技术(主要针对*P. pungens*, *Heterosigma akashiwo*和*Fibrocapsa japonica*等几种微藻),而且该技术的推广工作也不理想,到目前只有原创者及其相关实验室在开展相关研究。该技术可能存在两个问题:不能保证目标RNA分子的完整性,从而导致分析结果的不稳定;物种的靶序列与探针之间的差异不一定保证探针检测的特异性,其特异性还受实验条件的控制,然而夹心杂交在实验条件的控制上几乎没有选择的余地,这使得获得大量特异性检测探针几乎不可能,从而限制了它的发展。而双特异性探针技术只有NPA探针与rRNA分子杂交这一步是与rRNA分子直接相关的过程,只要在杂交裂解液加入适当的RNA酶抑制剂就能保证杂交时rRNA分子不被降解或很少被降解,而实验操作的其他步骤都是

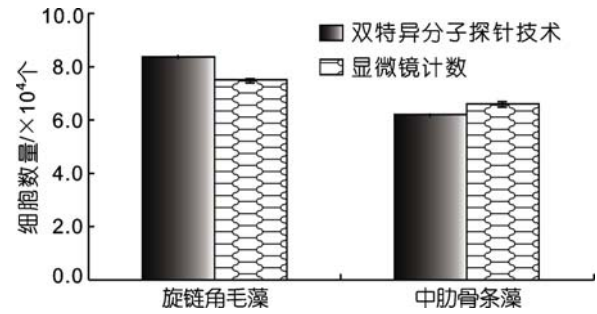


图8 双特异分子探针技术与显微镜计数检测胶州湾现场样品的结果比较

Fig.8 Comparison for natural samples in Jiaozhou Bay in quantitative results by NPA-SH and microscopic observation

针对稳定的DNA分子进行的,比较容易执行。作者配制的细胞裂解液中甲酰胺与SDS的联合作用可以在最大限度上抑制RNA酶活性,阻止其对细胞内RNA的降解,而又不至于影响下一步S1酶的酶切活性。

S1酶是单链特异性的核酸内切酶,能将单链DNA或RNA降解成为可溶性5'P核苷酸;在分子生物学研究领域该酶主要被用来除去DNA/DNA和DNA/RNA杂合体中的单链部分,双链DNA的末端平滑化,以及S1作图分析等。但是传统的S1酶保护分析需要进行聚丙烯酰胺凝胶电泳和放射自显影,由于其操作复杂而危险,电泳方法难于精确定量,所以不适合用于生物样品的分子定量研究。在本研究中,利用S1酶能够保护完全匹配的双链核酸的性质,将目标生物的rRNA转化为等量的互补DNA探针,既解决了RNA不稳定易于降解的难题,又将探针的专一性从DNA探针与RNA杂交一个层次,提高到对杂交真实性进行校验的第二个层次(也就是说特异结合的探针被保留,其它探针被分解),从根本上解决了探针种属特异性的难题。同时对杂交条件的控制,尤其是对杂交温度的深入研究保证了探针特异性的实现。这就使得本技术可以在一定条件下,准确分辨探针靶区存在的两个及两个以上碱基差异的物种(Cai *et al.*, 2006),使得分析形态学接近和进化关系密切的微藻成为可能,并使特异性探针的设计和获得相对于大部分其他分子生物学技术更为容易。因此本技术具有其它分子检测技术不可比拟的优点。从对现场样品的分析结果来看,样品中含有的旋链角毛藻和中肋骨条藻都可以被准确地检测出来,并与显微镜检查结果相一致。所以,只要设计合适的探针,在一定的条件下,本技术可以在藻类检测领域获得广泛的应用。



双特异分子探针技术具有良好的准确性和灵敏度。在本研究中, 旋链角毛藻、尖刺拟菱形藻和中肋骨条藻的最低检测细胞数分别是  $4.2 \times 10^4$ 、 $9.4 \times 10^3$  和  $6.0 \times 10^4$  个细胞, 如果检测现场样品时均收集 1 L 海水, 则它们的最低检测限分别为 42 cells/ml、9 cells/ml 和 60 cells/ml。1998 年胶州湾爆发的中肋骨条藻赤潮密度达到  $4.5 \times 10^3$  cells/ml (霍文毅等, 2001); 1990 年大鹏湾爆发的尖刺拟菱形藻赤潮密度达到  $2.7 \times 10^3$  cells/ml (齐雨藻等, 2003); 在胶州湾, 尖刺拟菱形藻常年出现, 11 月达到最大密度 100 cells/ml (Zou *et al*, 1993); 而胶州湾角毛藻的平均密度在夏季也达到 100 cells/ml (刘东艳等, 2003; 韩笑天等, 2004)。因此本方法可以用于对这些藻的长期监测计划。

### 参 考 文 献

- 刘东艳, 孙 军, 陈洪涛等, 2003. 2001 年夏季胶州湾浮游植物群落结构的特征. 青岛海洋大学学报, 33(3): 366—374
- 齐雨藻, 2003. 中国沿海赤潮. 北京: 科学出版社, 136—146
- 米铁柱, 甄 毓, 于志刚, 2003. 海洋浮游藻类检测技术发展展望. 高技术通讯, 13(3, 增刊): 96—100
- 张宝玉, 王广策, 齐雨藻等, 2005. 用荧光原位杂交 (FISH) 技术鉴定赤潮甲藻的研究. 高技术通讯, 15(11): 101—105
- 张宝玉, 王广策, 张 炎等, 2004. 东海原甲藻 (*Prorocentrum donghaiense*) 和海洋原甲藻 APBM (*P. micans* APBM) 的 5.8S rDNA 及其转录间隔区 (ITS) 的克隆和序列分析. 海洋与湖沼, 35(3): 264—272
- 姚 鹏, 于志刚, 米铁柱, 2003. 海洋浮游藻类的化学分类法. 海洋环境科学, 22(1): 75—80
- 韩笑天, 邹景忠, 张永山, 2004. 胶州湾赤潮生物种类及其生态分布特征. 海洋科学, 28(2): 49—54
- 梁君荣, 高 杨, 高亚辉等, 2005. 全细胞杂交在三种赤潮微藻检测中的应用. 高技术通讯, 15(12): 84—89
- 霍文毅, 俞志明, 邹景忠等, 2001. 胶州湾中肋骨条藻赤潮与环境因子的关系. 海洋与湖沼, 32(3): 311—318
- Cai Q S, Li R X, Zhen Y *et al*, 2006. Detection of two *Prorocentrum* species using sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay. Harmful algae, 5(3): 300—309
- Galluzzi L, Penna A, Bertozzini E *et al*, 2004. Development of a real-time PCR assay for rapid detection and quantification of *Alexandrium minutum* (a Dinoflagellate). Applied Environmental Microbiology, 70(2): 1199—1206
- Guillard R R L, 1973. Division rates. In: Stein ed. Handbook of Phycological Methods. V.1. Cambridge: Cambridge University Press, 289—312
- Guillard R R L, Ryther J H, 1962. Studies on marine Planktonic diatoms: I. *Cyclotella* *Hustedt* and *Detonula confervacea* (Cleve). Canadian Journal of Microbiology, 8: 229—239
- Jonker R R, Meulemans J T, Dubelaar G B J *et al*, 1995. Flow cytometry: a powerful tool in analysis of biomass distributions in phytoplankton. Water Science and Technology, 32(4): 177—182
- Koehne B, Elli G, Jennings R C *et al*, 1999. Spectroscopic and molecular characterization of a long-wave length absorbing antenna of *Ostreobium* sp.. Biochimica et Biophysica Acta / Bioenergetics, 1412: 94—107
- Scholin C A, Buck K R, Britschgi T *et al*, 1996a. Identification of *Pseudo-nitzschia australis* (Bacillariophyceae) using rRNA-targeted probes in whole cell and sandwich hybridization formats. Phycologia, 35: 190—197
- Scholin C A, Miller P, Buck K *et al*, 1996b. DNA probe-based detection of harmful algal species using *Pseudo-nitzschia* species as models. In: Oshima Y, Fukuyo Y ed. Harmful and Toxic Algal Blooms. Paris: Intergovernmental Oceanographic Commission of UNESCO, 439—422
- Sieracki C K, Sieracki M E, Yentsch C S, 1998. An imaging-inflow system for automated analysis of marine microplankton. Marine Ecology Progress Series, 168: 285—296
- Venugopalan C, Kapoor H C, 1997. Single step isolation of plant RNA. Phytochemistry, 46: 1303—1305
- Xin Z Y, Yu Z G, Wang T C *et al*, 2004. Identification and quantification of the toxic dinoflagellate *Gymnodinium* sp. with competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA). Harmful Algae, 4(2): 297—307
- Zou J Z, Zhou M J, Zhang Ch, 1993. Ecological features of toxic *Nitzschia pungens* Grunow in Chinese coastal waters. In: Smayda T J, Shimizu Y ed. Toxic phytoplankton blooms in the sea. Amsterdam: Elsevier Sci Publ B V, 651—657



## DETECTION OF THREE DIATOM SPECIES IN JIAOZHOU BAY USING SANDWICH HYBRIDIZATION INTEGRATED WITH NUCLEASE PROTECTION ASSAY

ZHEN Yu<sup>1</sup>, YU Zhi-Gang<sup>2</sup>, CAI Qing-Song<sup>3</sup>, MI Tie-Zhu<sup>1</sup>, LI Rong-Xiu<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory of Marine Environment and Ecology, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao, 266100;

2. Key Laboratory of Marine Chemistry Theory and Technology, Ministry of Education, Ocean University of China,

Qingdao, 266100; 3. School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200030)

**Abstract** Sandwich hybridization integrated with nuclease protection assay (NPA-SH) was developed and successfully applied in simultaneously detecting three diatoms species in Jiaozhou Bay [*Chaetoceros curvisetus* Cleve, *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow ex Cleve) Halse and *Skeletonema costatum* (Greville) Cleve] qualitatively and quantitatively. The new method can be well applied in analyzing samples in both laboratory and field. The detection limit to the three species was  $4.2 \times 10^4$ ,  $9.4 \times 10^3$  and  $6.0 \times 10^4$  cells, respectively. No distinct difference in result between the NPA-SH and the traditional microscopy. The NPA-SH can be completed in a short time of 7 h, in which 96-microplates are used. Therefore, a large amount of samples can be processed for multiple algae, which favors the timely monitoring on harmful algal blooms in marine environment.

**Key words** Jiaozhou Bay, *Chaetoceros curvisetus*, *Pseudo-nitzschia pungens*, *Skeletonema costatum*, Sandwich Hybridization integrated with Nuclease Protection Assay (NPA-SH)