

细胞凝集素探针对典型赤潮生物的定量检测

黄辉¹, 武模戈², 雷红灵³, 赖红艳^{3,4}, 侯建军^{3,4}

(1. 西南大学水产系, 重庆 荣昌 402460; 2. 濮阳职业技术学院生物系, 河南 濮阳 457000; 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; 4. 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070)

摘要: 采用 14 种异硫氰酸荧光素 (FITC) 标记的细胞凝集素探针对 23 株典型的有害赤潮生物进行了检测, 结合流式细胞仪、荧光显微镜、荧光分光光度计对探针标记区分和识别目标藻的特异性和有效性进行定性和定量测定。结果表明, DBA 可以把裸甲藻 (*Gymnodinium*) GIXM01 株与其他裸甲藻区分开; SBA、WGA 和 PNA 探针能定性或定量地区分形态相似的裸甲藻 GMDH01 和 TPXM01。PHA-E 和 SJA 能分别将塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) ATDH04、ATMJ02 株系与同种其他的藻株区分开; PNA 也能从同种其他株系中识别塔玛亚历山大藻 ATDH01、ATDH02、ATDH03 株系; UEA I 能从同种藻株中识别塔玛亚历山大藻 ATCI01-JN、ATCI01 藻株; RCA120 可以区分产毒水平不同的亚历山大藻属 (*Alexandrium*) 的 ASPGX01 和 ASPGX02。DBA、SBA、PNA 和 LCA 探针能定性和定量区分微小原甲藻 (*Prorocentrum minimum*) PMDH01 和 PMXM01; 而 PNA 探针仅能定量区分原甲藻属 (*Prorocentrum*) PDDH01 与 PMXM01。用 WGA 探针结合流式细胞仪、荧光显微镜、荧光分光光度等检测手段可以把探针标记的目标裸甲藻 GSPXM01 和 TPXM01 从米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi*)、东海原甲藻 (*P. donghaiense*) 和微小原甲藻 (*P. minimum*) 等组成的混合样品中区分开。[中国水产科学, 2008, 15(2): 279-292]

关键词: 细胞凝集素探针; 赤潮种类; 检测; 流式细胞仪; 荧光显微镜; 荧光分光光度计

中图分类号: X171 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2008)02-0279-14

形态学特征是检测和鉴定有害赤潮生物的主要手段^[1]。随着技术的进步和发展, 出现了一些新的用于区分有毒和无毒赤潮生物的技术手段, 并能用于对赤潮发生和发展情况进行现场监测。这些新的技术包括扫描电镜、高效液相色谱^[2]、PCR 技术^[3]、免疫荧光探针^[4]、细胞凝集素 (Lectin) 探针^[2-3]、荧光原位杂交技术^[1,3-4]、基于 DNA 序列分析设计的肽核酸 (PNA) 探针技术^[5] 以及基于蛋白分子标记和双相电泳的蛋白组学技术^[6]。在这些技术方案中, 细胞凝集素探针因其操作简便快速, 成为相对适用的检测技术^[2,4,7]。细胞凝集素 (Lectin) 是一种非免疫原性的糖结合蛋白, 有聚集细胞和沉淀糖复合物的特性^[8], 已发现其从细菌到高等脊椎动物等生物中都普遍存在^[9], 作为细胞内、细胞间或机体之间相互识别的分子^[10], 其有着重要的生理活性和生理功能。细胞凝集素具有识别细胞表面特异性糖基结构及其生理活性的

能力, 因此在许多生物学研究领域中, 可作为研究糖基结构的十分有用的探针工具^[7,10]。用细胞凝集素作为探针来检测有害赤潮生物的研究报道比较多, 但相关的定量研究还相对较少, 尤其是使用流式细胞术对细胞凝集素探针的定量研究未见报道, 集合使用多种细胞凝集素探针的工作也较少, 并且细胞凝集素的特异性是否能达到区分那些分类地位尚不确定的赤潮生物种类仍有待深入研究^[1]。迄今, 还未见有应用荧光标记的细胞凝集素探针对中国近海赤潮生物进行检测和鉴定的相关报道。本研究拟采用 14 种荧光标记的细胞凝集素探针, 采取定性和定量相结合的检测方式, 借助于荧光显微镜、荧光分光光度计和流式细胞仪 3 种检测手段, 对来自中国近海海域的典型赤潮生物进行检测和识别, 从而进一步验证使用细胞凝集素探针区分和识别来自中国近海海域形态相似的赤潮生物种类的特异性和有效性。

收稿日期: 2007-07-06; **修订日期:** 2007-10-09.

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 973 项目 (CEOHAB2001CB409704); 厦门市创新科技基金项目 (3502Z20041059); 中国博士后基金项目 (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); 及教育部博士点基金项目 (20070504076)。

作者简介: 黄辉 (1967-), 男, 实验师, 主要从事水产养殖和渔业生态环境研究。

通讯作者: 侯建军 (1966-), 男, 教授, 博士, 主要从事环境科学和分子生态学研究。E-mail: jjh@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 供试藻类

用于本实验的藻株绝大部分为近年来分离自中国近海的典型赤潮生物,共 23 株(表 1)。藻株的选择除了考虑选用常见赤潮生物外,尽量更多地选用同种的不同细胞株或近年来新增的细胞种

(株)以及产毒水平不同的细胞株如亚历山大藻 ASPGX01 和 ASPGX02(张树刚,私人交流)。样品均用 2.5% 的戊二醛固定。混和样品的组成为 TPXM01、GSPXM01、AMTW、PDDH01、PMDH01、PMXM01、GMDH01 和 CCMP1740。

表 1 实验用赤潮藻株及其来源

Tab.1 Sources of harmful algal species and strains tested with FITC-conjugated lectin probes in this study

藻种 Species	株名 Strains	来源 Locations	分离时间 Isolation year
塔玛亚历山大藻 <i>Alexandrium tamarense</i>	ATDH01	东海 East China Sea	2002
	ATDH02	东海 East China Sea	2003
	ATDH03	东海 East China Sea	2003
	ATDH04	东海 East China Sea	2003
	ATMJ01	闽江河口 Minjiang River Estuary	2003
	ATMJ02	闽江河口 Minjiang River Estuary	2003
	ATCI01	南海 South China Sea	1998
	ATCI01-JN	南海 South China Sea	1999
	ATHK9301	南海 South China Sea	1993
链状亚历山大藻 <i>A. catenella</i>	ACDH01	东海 East China Sea	2002
	ACDH03	东海 East China Sea	2002
亚历山大藻属 <i>Alexandrium</i> sp.	ASPGX01	南海 South China Sea	2000
	ASPGX02	南海 South China Sea	2000
	ASPDH01	东海 East China Sea	2001
微小亚历山大藻 <i>A. minutum</i>	AMTW	台湾近岸水域 Taiwan coastal waters	1999
米氏凯伦藻 <i>Karenia mikimotoi</i>	GMDH01	东海 East China Sea	2000
纤小裸甲藻 <i>Takayama pulchellum</i>	TPXM01	厦门港 Xiamen Bay	2003
血红哈卡藻 <i>Akashiwo sanguinea</i>	CCMP1740	加勒比海 Caribbean Sea	1994
无纹环沟藻 <i>Gyrodinium instriatum</i>	GIXM01	厦门港 Xiamen Bay	2004
裸甲藻 <i>Gymnodinium</i> sp.	GSPXM01	厦门港 Xiamen Bay	2004
东海原甲藻 <i>Prorocentrum donghaiense</i>	PDDH01	东海 East China Sea	2002
微小原甲藻 <i>P. minimum</i>	PMDH01	东海 East China Sea	2003
	PMXM01	厦门港 Xiamen Bay	2004

1.2 荧光标记细胞凝集素探针的应用

探针应用方法根据 Rhodes 等^[7]和 Rodas 等^[4]的报道进行了改进。FITC 标记的细胞凝集素探针新鲜溶液(100 μg/mL)参考 Kim 等^[11]的方法配置。细胞凝集素探针均购自 Vector Laboratories Inc.(Burlingame, CA, FLK-2100; FLK-3100)。用于实验的 23 株藻在 f/2 培养基中单种培养,收集的藻细胞处于指数生长期,采用离心法进行收集

(3 000 g, 10 min, 4 °C, f/2 培养液重复清洗 2 次)。最后将清洗的藻细胞沉淀物分别加入 FITC 标记的 14 种细胞凝集素探针(100 μg/mL)1 mL,根据离心收集前的密度估算,使其在 1 mL 中的密度达到约 10⁵ cells/mL 左右。样品在暗处于 20 °C 保温标记 1 h。没有结合的探针用人工海水通过离心洗涤的方式去除。本研究所用的探针数量和种类详见表 2。

表 2 本研究使用的细胞凝集素探针种类
Tab.2 Lectin probes used in this study

细胞凝集素探针 Lectin probe	来源 Sources	糖基特异性 Specificity
半刀豆球蛋白 A ConA	直生刀豆种子 Jack bean (<i>Canavalia ensiformis</i>) seeds	methyl α - mannopyranoside; D - mannose; D-glucose
双花扁豆凝集素 DBA	马豆种子 Horse gram (<i>Dolchos biflorus</i>) seeds	N - acetyl - D-galactosamine
花生凝集素 PNA	花生 Peanut (<i>Arachis hypogaea</i>)	α - Lactose; D - galactose
蓖麻凝集素 RCA120	蓖麻 Castor bean (<i>Ricinus communis</i>)	β - D -galactose
大豆凝集素 SBA	大豆 Soy bean (<i>Glycine maxima</i>)	N- Acetyl- D- galactosamine; D-galactose; methyl α -D-galactopyranoside
荆豆凝集素 UEA I	荆豆 Gorse (<i>Ulex europaeus</i>)	L-flucose
麦芽凝集素 WGA	麦芽 Wheat germ (<i>Triticum vulgaris</i>)	N-Acetylglucosamine
<i>Griffonia implicifolia</i> 凝集素 GSL I	<i>Griffonia imphcifolia</i> (<i>Bandeiraea simplicifolia</i>)	α -galactose; N-acetylgalactosamine; galactose; raffinose
扁豆凝集素 LCA	扁豆种子 Lentil (<i>Lens culinaris</i>) seeds	α -methyl mannoside; α -methyl glucoside
菜豆凝集素 PHA-E	菜豆 Red kidney bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	N-Acetyl-D-galactosamine
菜豆凝集素 PHA-L	菜豆 Lima bean (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	N-Acetyl-D-galactosamine; acetic acid
豌豆凝集素 PSA	豌豆 Garden pea (<i>Pisum sativum</i>)	α -methyl mannoside; α -methyl glucoside
槐凝集素 SJA	槐 Japanese pagoda tree (<i>Sophora japonica</i>)	N-acetylgalactosamine
琥珀酰麦芽凝集素 Succinylated WGA	麦芽 Wheat germ (<i>Triticum vulgaris</i>)	Chitin Hydrolysate; N-acetylglucosamine

1.3 荧光显微镜的定性和定量观察

荧光显微镜的观察方法根据 Rodas 等^[4]和 Rhodes 等^[7]的方法改进。将被细胞凝集素探针标记的微藻置于落射荧光显微镜下进行观察。观察前需加入 10 μ L 防止荧光淬灭的 citifluor 试剂(其中含 1 μ g/mL DAPI, Sigma)进行复染。显微镜为 Zeiss Axioskop 40, 其中滤片组 01(紫外激发蓝光, 针对 DAPI 染色); 滤片组 02(蓝光激发绿光, 针对 FITC 染色)。阳性染色细胞的定量计数采用如下标准进行^[4]: 3+, 明亮的绿色荧光; 2+, 较亮的绿色荧光; “+”, 较低的绿色荧光, 但明显不同于对照组的自发荧光; “—”, 没有绿色荧光信号检出, 或只有黄色的自发荧光。定量计数上述标准下每种标记染色强度的细胞数量。检测方法采取盲测法。

1.4 荧光分光光度计的定量测定

用于荧光分光光度计检测的样品及细胞凝集素探针对所有目标藻的标记、处理方法同 1.2, 并用标准细胞凝集素探针制作荧光强度的标准曲线; 荧光标记强度用荧光分光光度计 (RF-5301PC, Shimadzu) 进行定量测定, 激发波长为 490 nm, 发射波长为 515 nm。定性及定量检测时均采用未经细胞凝集素探针处理的赤潮藻作为自发荧光对照组^[4]。对上述实验组和对照组中的细胞用显微镜

进行明视野计数, 每个样品重复计数 4 次。

1.5 流式细胞仪分析方法

将赤潮藻细胞采用 1% 的多聚甲醛在 4 $^{\circ}$ C 下固定 1 h, 然后将样品悬浮于乙醇: PBS=70: 30 (*V: V*) 的溶液中进行脱色; 再用人工海水(盐度 28, pH 8.0)洗涤 2 次, 然后将 $10^5 \pm 10^3$ 个细胞分别加入细胞凝集素探针溶液 (100 μ g/mL) 1 mL, 20 $^{\circ}$ C 下于暗条件下标记 1 h。然后将样品用 f/2 培养液洗涤 3 次, 并将藻细胞悬浮于 PBS 中 (pH 9.0)。将处理好的样品用流式细胞仪 (Beckman Coulter Epics Altra II) 进行分析检测(标准滤片组, 激光波长 488 nm, 功率 50 mW)。

1.6 统计分析

对用细胞凝集素探针标记后定量检测的数据进行统计分析, 对每种细胞凝集素探针结合后的相关组(如相同种的不同株或形态相似的藻株, 或有毒、无毒的细胞株)进行组间成对 *t* 检验, *P*<0.05 表示差异显著。上述统计均采用 MS Excel 2002 和 SPSS (SPSS 11.0, 2001) 等软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 细胞凝集素探针和裸甲藻 (*Gymnodinium*) 的特异性结合及流式细胞仪的检测效果

在所用的全部细胞凝集素探针中, 除了

GMDH01 不能与 PHA-E、SBA、WGA、GSL I 结合, TPXM01 不能与 PHA-E、GSL I 结合, GMXM01 不能与 GSL I、DBA 结合, CCMP1740 不能与 PHA-E 结合外,其他细胞凝集素探针均能与其余的裸甲藻发生特异性结合(赤潮藻株名称缩写见表1,细胞凝集素名称见表2)。在阳性染色细胞中,细胞凝集素探针染色强度存在差异(表3、4)。GMDH01、TPXM01 和 GSPXM01 是形态上相似的种类,但与探针 SBA、WGA、GSL I、DBA 和 PHA-E 均表现出不同的结合能力,如 DBA 可以将 GIXM01 和其他裸甲藻区分开。尽管 GMDH01 和 TPXM01 的形态十分相似,用 SBA 和 WGA 均能从定性(表3)

和定量(表4)角度较好地区分二者;二者也能和 PNA、UEA I 发生一定程度的结合,单从简单定性的角度无法区分二者,但其定量结合强度却有明显的统计学差异($P<0.05$),因此要使用这两种探针,则必须从定量的角度去区分。其荧光强度数据如表3、4所示。其他探针的阳性结合,与 PNA、UEA I 一样,从定性的角度均无法准确区分。这时候必需结合定量数据。如果荧光结合强度有显著差异,则可以对其进行区分。GSL I 虽然能和裸甲藻 CCMP1740 及 GSPXM01 微弱结合,PHA-E 也能和 GIXM01、GSPXM01 微弱结合,但其探针效能较低,不宜采用其去区分这些裸甲藻种类。

表3 荧光标记的细胞凝集素探针对不同赤潮藻的阳性染色百分率

Tab. 3 Percentage of harmful algae bound with FITC-labeled lectins

%

微型赤潮藻 Microalgae	对照 Control	ConA				DBA				PNA				RCA120			
		探针染色强度 Staining quality				探针染色强度 Staining quality				探针染色强度 Staining quality				探针染色强度 Staining quality			
		-	3+	2+	1+	-	3+	2+	1+	-	3+	2+	1+	-	3+	2+	1+
塔玛亚历山大藻 <i>Alexandrium tamarense</i>																	
ATDH01	100	100	0	0	0	87	9	4	0	6	89	5	0	13	30	57	0
ATDH02	100	82	18	0	0	7	70	19	4	0	75	21	4	6	34	60	0
ATDH03	100	100	0	0	0	30	48	22	0	7	48	30	15	0	61	39	0
ATDH04	100	88	12	0	0	40	50	10	0	0	1	33	66	2	25	67	6
ATMJ01	100	93	7	0	0	10	55	35	0	0	0	43	57	8	54	38	0
ATMJ02	100	94	6	0	0	0	66	34	0	0	0	48	52	3	59	36	2
ATCI01	100	92	8	0	0	0	81	19	0	0	0	42	58	1	51	45	3
ATCI01-JN	100	86	14	0	0	52	39	9	0	0	0	73	27	0	23	68	9
ATHK9301	100	82	0	16	2	46	40	14	0	0	0	80	20	0	19	81	0
链状亚历山大藻 <i>A. catenella</i>																	
ACDH01	100	100	0	0	0	2	66	32	0	0	7	89	4	4	74	22	0
ACDH03	100	97	3	0	0	4	75	21	0	0	0	79	21	0	9	91	0
亚历山大藻 <i>Alexandrium</i> sp.																	
ASPGX01	100	100	0	0	0	6	90	4	0	0	1	84	15	58	36	6	0
ASPGX02	100	91	9	0	0	0	6	94	0	0	0	33	67	0	15	15	70
ASPDH01	100	66	29	5	0	0	8	80	12	0	0	55	45	0	56	44	0
微小亚历山大藻 <i>A. minutum</i>																	
AMTW	100	0	0	76	24	2	63	35	0	9	57	34	0	0	16	84	0
裸甲藻 <i>Gymnodinium</i>																	
GMDH01	100	0	86	8	6	0	48	52	0	0	0	6	94	0	0	89	11
TPXM01	100	0	0	83	17	0	6	78	16	0	0	65	35	0	16	84	0
CCMP1740	100	76	18	6	0	14	42	44	0	0	50	46	4	16	63	21	0
GIXM01	100	0	91	9	0	0	0	0	100	0	0	79	21	40	49	11	0
GSPXM01	100	0	0	85	15	0	45	55	0	0	0	68	32	0	26	74	0
原甲藻 <i>Prorocentrum</i>																	
PDDH01	100	0	90	6	4	4	92	4	0	0	0	63	37	0	0	79	21
PMDH01	100	0	0	53	47	0	0	92	8	0	0	6	94	0	0	66	21
PMXM01	100	0	0	51	49	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	83	17

续表 3

微型赤潮藻 Microalgae	SBA				UEAI				WGA				GSLI				LGA			
	探针染色强度 Staining quality				探针染色强度 Staining quality				探针染色强度 Staining quality				探针染色强度 Staining quality				探针染色强度 Staining quality			
	3+	2+	1+	-	3+	2+	1+	-	3+	2+	1+	-	3+	2+	1+	-	3+	2+	1	-
塔玛亚历山大藻 <i>Alexandrium tamarense</i>																				
ATDH01	0	39	61	0	0	0	61	39	5	19	63	13	0	0	0	100	86	8	6	0
ATDH02	0	41	59	0	0	0	2	98	0	2	52	46	0	0	0	100	70	13	15	2
ATDH03	0	8	82	10	0	0	6	94	0	0	23	77	0	0	0	100	66	34	0	0
ATDH04	0	17	83	0	0	0	9	91	7	49	34	10	0	0	0	100	79	19	2	0
ATMJ01	0	9	64	27	0	0	5	95	0	24	52	24	0	0	0	100	81	8	11	0
ATMJ02	3	24	70	3	0	0	6	94	0	0	25	75	0	0	0	100	77	15	8	0
ATCI01	0	8	79	13	10	84	6	0	14	70	16	0	0	0	0	100	92	5	3	0
ATCI01-JN	0	56	38	6	26	68	6	0	30	54	13	3	0	0	0	100	73	22	2	3
ATHK9301	0	0	79	21	0	17	71	12	4	58	38	0	0	0	0	100	70	16	10	4
链状亚历山大藻 <i>Alexandrium catenella</i>																				
ACDH01	0	8	79	13	6	27	67	0	0	72	28	0	0	0	0	100	77	21	2	0
ACDH03	0	0	97	3	3	19	78	0	34	66	0	0	0	0	0	100	74	22	4	0
亚历山大藻属 <i>Alexandrium</i> sp.																				
ASPGX01	0	62	38	0	0	15	82	3	0	28	72	0	0	0	0	100	96	4	0	0
ASPGX02	3	8	77	12	0	0	32	68	0	18	66	16	0	0	0	100	58	11	4	0
ASPDH01	0	10	84	6	0	2	35	63	0	3	60	37	0	0	0	100	73	27	0	0
微小亚历山大藻 <i>A. minutum</i>																				
AMTW	0	0	79	21	0	22	72	6	6	87	7	0	0	0	0	100	64	35	1	0
裸甲藻 <i>Gymnodinium</i>																				
GMDH01	0	0	0	100	0	0	14	86	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	67	33
TPXM01	0	0	100	0	0	0	84	16	31	53	16	0	0	0	0	100	0	71	29	0
CCMP1740	11	60	29	0	0	0	96	4	72	24	4	0	0	0	8	92	40	40	20	0
GIXM01	0	56	44	0	6	67	27	0	46	28	26	0	0	0	0	100	39	46	15	0
GSPXM01	0	0	71	29	0	0	69	31	100	0	0	0	0	0	20	80	11	58	31	0
原甲藻 <i>Prorocentrum</i>																				
PDDH01	0	0	0	100	0	0	5	95	0	0	0	100	0	0	0	100	0	36	60	4
PMDH01	0	0	10	90	0	0	12	88	0	0	0	100	0	0	0	100	0	17	80	3
PMXM01	0	0	0	100	0	0	3	97	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100

续表 3

微型赤潮藻 Microalgae	PHA-E				PHA-L				PSA				SJA				Succinylated WGA			
	探针染色强度 Staining quality				探针染色强度 Staining quality				探针染色强度 Staining quality				探针染色强度 Staining quality				探针染色强度 Staining quality			
	3+	2+	1+	-	3+	2+	1+	-	3+	2+	1+	-	3+	2+	1+	-	3+	2+	1	-
塔玛亚历山大藻 <i>Alexandrium tamarense</i>																				
ATDH01	0	42	56	2	0	25	75	0	0	29	65	6	0	8	90	2	0	20	80	0
ATDH02	0	29	65	6	0	2	95	3	0	13	76	11	0	8	85	7	0	8	89	3
ATDH03	0	24	76	0	0	12	88	0	0	36	64	0	0	4	96	0	0	23	77	0
ATDH04	61	39	0	0	1	52	47	0	0	26	64	10	8	85	7	0	3	17	80	0
ATMJ01	0	43	57	0	0	32	68	0	0	29	70	1	0	7	90	3	0	24	76	0
ATMJ02	0	32	65	3	0	27	73	0	0	28	68	4	0	4	8	88	0	6	92	2
ATCI01	15	62	17	6	1	55	44	0	0	28	68	4	6	70	18	6	42	46	11	1
ATCI01-JN	0	64	23	13	0	63	33	4	2	16	82	0	1	52	37	10	3	78	14	5
ATHK9301	0	58	34	8	0	13	87	0	23	21	55	1	4	69	27	0	0	59	36	5
链状亚历山大藻 <i>A. catenella</i>																				
ACDH01	62	24	12	2	0	62	34	4	14	63	19	4	11	51	32	6	18	66	16	0
ACDH03	45	36	16	3	1	83	16	0	7	69	21	3	6	51	43	0	3	56	41	0
亚历山大藻属 <i>Alexandrium</i> sp.																				
ASPGX01	93	7	0	0	0	3	97	0	84	11	5	0	0	32	66	2	1	90	9	0
ASPGX02	62	38	0	0	0	0	100	0	79	20	1	0	0	24	71	5	0	68	28	4
ASPDH01	56	34	7	3	0	2	91	7	80	18	2	0	1	20	68	11	1	69	21	9
微小亚历山大藻 <i>A. minutum</i>																				
AMTW	11	43	39	7	0	18	82	0	9	15	67	9	9	66	25	0	2	68	30	0
裸甲藻 <i>Gymnodinium</i>																				
GMDH01	0	0	0	100	0	100	0	0	0	72	28	0	13	87	0	0	0	100	0	0
TPXM01	0	0	0	100	0	73	27	0	0	90	10	0	0	98	2	0	0	100	0	0
CCMP1740	0	0	0	100	0	16	84	0	44	41	15	0	0	61	39	0	0	100	0	0
GIXM01	0	0	28	72	5	23	72	0	54	32	14	0	2	38	55	5	0	21	75	4
GSPXM01	0	0	20	80	0	20	80	0	2	38	60	0	0	32	68	0	0	100	0	0
原甲藻 <i>Prorocentrum</i>																				
PDDH01	0	0	70	30	0	0	100	0	15	71	14	0	0	0	100	0	0	11	89	0
PMDH01	0	0	4	96	0	0	100	0	2	16	82	0	0	15	78	7	0	70	30	0
PMXM01	0	0	8	92	0	0	100	0	2	0	88	0	0	0	53	47	0	0	100	0

注: 染色强度的目视定量测定指标: 3+, 染色明亮; 2+, 染色较明亮; 1+, 染色强度较低; -, 无染色的荧光信号。表中的数据为各细胞凝集素探针在每种染色强度下的阳性染色百分率; 在每种染色强度下, 至少计数统计 100 个赤潮藻细胞的染色情况。缩写词详见表 1 和表 2。

Note: Index of optical examination of staining quality: 3+, bright stain; 2+, less bright; 1+, low-intensity stain; -, undetectable. Numbers indicate percentage of HAB species bound with each lectin. At least 100 HAB species were analyzed in each case. Abbreviations are provided in table 1 and table 2.

表 4 不同的赤潮藻与不同的细胞凝集素探针结合的荧光定量数值
Tab. 4 Quantitative values of fluorescence of harmful algae species bound with different lectins

$n=4$; $\bar{X} \pm SD$; ng (FITC)/10 000 cells

微型赤海藻 Microalgae	对照组 Control	细胞凝集素探针 Lectin probes						
		ConA	DBA	PNA	RCA120	SBA	UEA I	WGA
塔玛亚历山大藻 <i>Alexandrium tamarense</i>								
ATDH01	0.65±0.15	5.63±0.78	5.45±0.66	4.96±0.59 ^a	3.29±0.91	3.46±0.63	2.56±0.87 ^b	3.96±0.81
ATDH02	0.78±0.18	5.31±0.56	5.12±0.81	4.82±0.46 ^a	3.37±0.86	3.38±0.59	1.91±0.46 ^b	2.85±0.63
ATDH03	0.56±0.16	5.71±0.76	5.03±0.73	4.53±0.38 ^a	3.34±0.72	3.57±0.48	1.80±0.53 ^b	2.01±0.45
ATDH04	0.49±0.21	5.25±0.49	5.11±0.49	3.16±0.57 ^b	3.25±0.34	3.44±0.79	1.98±0.67 ^b	3.91±0.72
ATMJ01	0.57±0.12	5.21±0.38	4.98±0.57	2.92±0.63 ^b	3.51±0.69	3.29±0.67	1.72±0.39 ^b	3.87±0.49
ATMJ02	0.65±0.23	5.56±0.86	4.69±0.98	3.11±0.67 ^b	3.39±0.71	3.68±0.76	1.67±0.79 ^b	2.14±0.67
ATCI01	0.71±0.20	5.43±0.52	4.76±0.68	3.02±0.52 ^b	3.12±0.56	3.21±0.92	3.97±0.75 ^a	4.11±0.75
ATCI01-JN	0.59±0.18	5.36±0.39	5.13±0.57	3.39±0.73 ^b	3.17±0.49	3.35±0.86	3.88±0.63 ^a	4.13±0.58
ATHK9301	0.55±0.13	5.19±0.49	5.26±0.65	3.49±0.82 ^b	3.27±0.88	3.37±0.58	2.95±0.49 ^b	4.22±0.77
链状亚历山大藻 <i>A. catenella</i>								
ACDH01	0.87±0.24	5.66±0.82	4.15±0.65	3.52±0.49	3.59±0.38	3.36±0.65	3.86±0.46	4.28±0.85
ACDH03	0.81±0.17	5.61±0.75	4.26±0.37	3.38±0.57	3.22±0.46	3.41±0.74	3.75±0.64	4.39±0.74
亚历山大藻属 <i>Alexandrium</i> sp.								
ASPGX01	0.62±0.25	6.08±0.72	4.86±0.59	3.63±0.79	4.92±0.87 ^a	4.12±0.66	3.87±0.58 ^A	3.84±0.80
ASPGX02	0.53±0.20	5.93±0.69	3.78±0.63	3.01±0.65	3.11±0.49 ^b	4.08±0.75	2.02±0.44 ^B	3.76±0.64
ASPDH01	0.72±0.26	5.26±0.81	3.73±0.76	3.21±0.78	3.16±0.53 ^b	3.98±0.57	2.17±0.56 ^B	3.58±0.56
微小亚历山大藻 <i>A. minutum</i>								
AMTW	0.67±0.19	3.41±0.67	4.57±0.62	4.89±0.67	3.22±0.37	2.76±0.59	3.78±0.38	3.97±0.41
裸甲藻 <i>Gymnodinium</i>								
GMDH01	0.38±0.21	4.15±0.46	3.52±0.71	1.86±0.59 ^B	3.28±0.55	1.98±0.47	2.01±0.66 ^Y	1.78±0.57
TPXM01	0.41±0.16	3.19±0.51	3.18±0.67	3.35±0.64 ^A	3.11±0.87	3.72±0.51	3.56±0.53 ^X	4.06±0.86
CCMP1740	0.59±0.19	5.18±0.59	4.23±0.39	3.98±0.52	3.51±0.39	3.85±0.63	3.97±0.62	5.65±0.43
GIXM01	0.35±0.22	4.32±0.73	1.71±0.59	3.17±0.76	3.78±0.93	3.67±0.71	3.89±0.81	5.08±0.78
GSPXM01	0.39±0.15	3.29±0.78	3.46±0.81	3.43±0.58	3.49±0.54	3.62±0.44	2.93±0.73	5.89±0.66
原甲藻 <i>Prorocentrum</i>								
PDDH01	0.49±0.11	4.27±0.65	4.10±0.56	3.46±0.78 ^X	3.19±0.67	1.70±0.56	2.03±0.81	1.88±0.55
PMDH01	0.33±0.10	3.51±0.45	3.12±0.66	2.01±0.49 ^Y	3.25±0.88	1.92±0.75	1.92±0.73	1.79±0.76
PMXM01	0.38±0.34	3.53±0.68	1.63±0.78	1.71±0.57 ^Y	3.18±0.63	1.63±0.68	1.98±0.63	1.76±0.63

续表 4

微型赤海藻 Microalgae	对照组 Control	细胞凝集素探针 Lectin probes						
		GSL I	PHA-E	PHA-L	LCA	PSA	SJA	Succinglated- WGA
塔玛亚历山大藻 <i>Alexandrium tamarense</i>								
ATDH01	0.65±0.15	1.38±0.46	3.28±0.95 ^b	3.38±0.54	5.56±0.84	3.31±0.62	3.49±0.50 ^a	3.51±0.37
ATDH02	0.78±0.18	1.70±0.89	3.71±0.89 ^b	3.46±0.67	5.89±0.72	3.28±0.41	3.35±0.38 ^a	3.40±0.46
ATDH03	0.56±0.16	1.51±0.87	3.43±0.44 ^b	3.21±0.39	5.41±0.91	3.35±0.59	3.41±0.47 ^a	3.32±0.39
ATDH04	0.49±0.21	1.39±0.56	5.84±0.61 ^a	3.63±0.76	5.44±0.87	3.57±0.64	3.78±0.32 ^a	3.50±0.81
ATMJ01	0.57±0.12	1.42±0.88	4.01±0.87 ^b	3.55±0.65	5.39±0.56	3.46±0.38	3.56±0.68 ^a	3.38±0.72
ATMJ02	0.67±0.23	1.56±0.77	3.93±0.86 ^b	3.35±0.78	5.36±0.49	3.57±0.66	2.02±0.51 ^b	3.45±0.67
ATCI01	0.71±0.20	1.67±0.74	4.06±0.57 ^b	3.68±0.49	5.23±0.78	3.33±0.56	3.72±0.83 ^a	3.83±0.76
ATCI01-JN	0.59±0.18	1.53±0.88	4.12±0.46 ^b	3.71±0.57	5.21±0.57	3.30±0.67	3.67±0.59 ^a	3.47±0.95
ATHK9301	0.55±0.13	1.46±0.48	4.08±0.77 ^b	3.44±0.79	5.36±0.90	4.16±0.82	3.65±0.46 ^a	3.66±0.87
链状亚历山大藻 <i>A.catenella</i>								
ACDH01	0.87±0.24	1.69±0.72	4.99±0.59	3.60±0.59	5.09±0.87	3.85±0.57	3.78±0.69	4.11±0.59
ACDH03	0.81±0.17	1.58±0.79	5.14±0.64	3.59±0.47	5.17±0.55	3.76±0.45	3.67±0.72	4.08±0.49
亚历山大藻属 <i>Alexandrium</i> sp.								
ASPGX01	0.62±0.25	1.40±0.71	5.99±0.68	3.34±0.51	6.02±0.81	5.36±0.69	3.41±0.31	3.97±0.56
ASPGX02	0.53±0.20	1.37±0.90	5.66±0.34	3.41±0.49	6.11±0.35	5.25±0.57	3.32±0.56	3.78±0.46
ASPDH01	0.72±0.26	1.46±0.75	4.92±0.41	3.29±0.78	5.98±0.77	5.43±0.74	3.39±0.47	3.69±0.55
微小亚历山大藻 <i>A. minutum</i>								
AMTW	0.67±0.19	1.62±0.88	4.46±0.55	3.56±0.63	5.87±0.81	4.32±0.78	4.07±0.79	3.63±0.44
裸甲藻 <i>Gymnodinium</i>								
GMDH01	0.38±0.21	1.58±0.39 ^b	1.68±0.36	3.78±0.85	2.98±0.54	3.35±0.63	3.87±0.75	3.82±0.36
TPXM01	0.41±0.16	1.67±0.44 ^b	1.82±0.83	3.63±0.73	4.75±0.49	3.47±0.58	3.69±0.64	3.79±0.78
CCMP1740	0.59±0.19	1.99±0.76 ^{ab}	1.59±0.49	3.31±0.56	4.01±0.48	4.16±0.71	3.35±0.78	3.63±0.85
GIXM01	0.35±0.22	1.65±0.57 ^b	1.88±0.71	3.59±0.71	4.80±0.72	4.32±0.85	3.63±0.46	3.57±0.66
GSPXM01	0.39±0.15	2.91±0.50 ^a	1.92±0.66	3.67±0.82	4.12±0.75	3.21±0.59	3.33±0.71	3.81±0.83
原甲藻 <i>Prorocentrum</i>								
PDDH01	0.49±0.11	1.62±0.68	3.96±0.79	3.43±0.51	3.03±0.56	4.13±0.67	3.55±0.57	3.49±0.43
PMDH01	0.33±0.10	1.39±0.57	2.21±0.68	3.47±0.43	3.22±0.71	3.23±0.49	3.72±0.59	4.14±0.86
PMXM01	0.38±0.34	1.91±0.49	2.08±0.45	3.39±0.46	1.56±0.63	3.38±0.53	3.16±0.45	3.51±0.77

注：表 4 中的数据为探针的荧光定量测定值 ($\bar{X} \pm SD$)。缩写词详见表 1、2；同一列中具有不同系列字母上标的各项间荧光定量强度有显著差异 ($P < 0.05$)。

Note: Numbers indicate quantitative values of fluorescence ($\bar{X} \pm SD$). Abbreviations are provided in tab. 1 and tab. 2; The different series of superscript letters of the data in the same column showed that the differences in the quantitative fluorescence values of these items were statistically significant ($P < 0.05$).

流式细胞仪分析表明,分离自厦门港的裸甲藻 GSPXM01 和各种细胞凝集素探针结合时其荧光信号强度有所不同。图 1 显示,细胞凝集素探针结合

流式细胞仪能从不同样品中将目标藻细胞准确地识别出来,并可以对这些阳性藻细胞进行较为准确的荧光定量分析(图 1)。

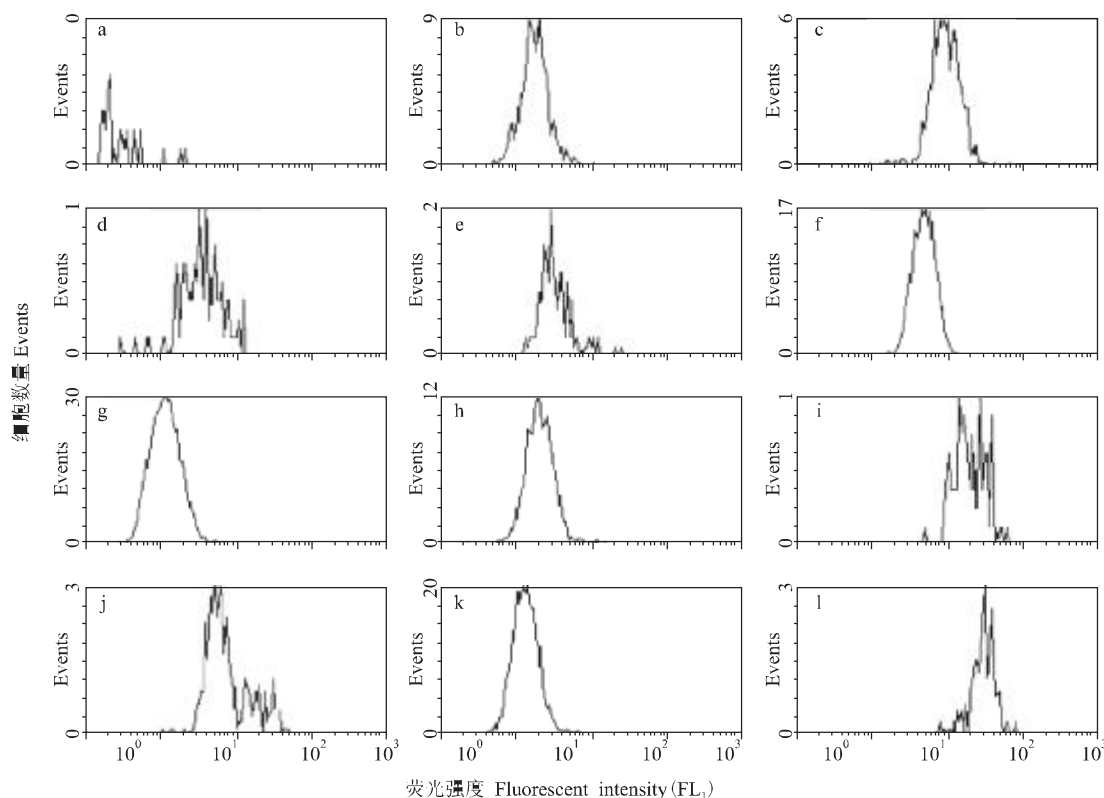


图1 各种 FITC 标记细胞凝集素探针和裸甲藻 GSPXM01 结合时用流式细胞仪测定分析的荧光信号图谱

a. 无探针对照组; b. SJA; c. PSA; d. SBA; e. PNA; f. LCA; g. PHA-L; h. GSL I; i. S-WGA; j. RCA120; k. UEA I; l. ConA.

Fig.1 Fluorescence signals for GSPXM01 bound with different FITC-labeled lectin probes based on flow cytometric analysis

a. Without lectin probe; b. SJA; c. PSA; d. SBA; e. PNA; f. LCA; g. PHA-L; h. GSL I; i. S-WGA; j. RCA120; k. UEA I; l. ConA.

2.2 细胞凝集素探针和亚历山大藻的特异性结合

几乎所有亚历山大藻属的各细胞株都能和除 GSL I 外的其余 13 种细胞凝集素探针发生结合, 但结合强度不同 (表 3、4)。可用荧光分光光度计和流式细胞仪来检测这些细胞凝集素探针标记各细胞株所产生的强度不同的荧光信号 (表 4)。图 1 可代表被不同探针标记的藻株, 其荧光图谱和荧光信号强度的差异, 显示流式细胞仪能准确区分细胞凝集素探针标记的阳性细胞、阴性细胞并将目标藻与自发荧光、背景颗粒的非特异性结合区分开。亚历山大藻是具有纤维素甲板的藻类, 它们和 ConA、LCA、PHA-E、PHA-L、PSA、WGA 及 S-WGA 等探针表现出强烈的结合能力 (表 2)。有些细胞凝集素探针标记信号较弱, 如 UEA I 标记 ATDH02、ATDH03、ATDH04、ATMJ01、ATMJ02; SJA 标记 ATMJ02; PNA 标记 ATDH04; 以及 WGA 标记 ATDH03 和 ATMJ02。采用荧光分光光度计

或 FCM 进行精确的荧光定量测定, 表明细胞凝集素探针可有效地区分同种藻的不同细胞株系。如 PHA-E 能从其他各亚历山大藻种中区分 ATDH04 [染色强度为 3+, 阳性结合率为 61%, 荧光定量数值为 $(5.84 \pm 0.61) \text{ ng (FITC) / } 10\,000 \text{ cells}$], 该细胞凝集素探针标记该株后产生的荧光强度和其他藻株的强度差异显著 ($P < 0.05$)。探针 SJA 和 ATMJ02 结合产生的荧光强度及数值为: 1+, 88%, 荧光强度为 $(2.02 \pm 0.51) \text{ ng (FITC) / } 10\,000 \text{ cells}$, 与该探针标记的 ATMJ01 等其他藻株荧光强度差异很明显 ($P < 0.05$)。与此类似, ATDH01、ATDH02、ATDH03 与 PNA 探针结合产生的荧光强度与同属其他细胞株之间差异也很显著 ($P < 0.05$); UEA I 可以从其他藻中定量区分 ATCI01-JN、ATCI01。更有意义的是, 亚历山大藻中的 ASPGX01 和 ASPGX02 是两株产毒水平不同的细胞株, UEA I 和 RC120 均能将二者区分开 ($P < 0.05$), 详见表 4。

2.3 细胞凝集素探针和原甲藻的特异性结合

3种原甲藻藻株(表1)与探针DBA、PNA、LCA和SBA表现出不同的结合能力(表3、4)。探针DBA、SBA、PNA和LCA能与PMDH藻株特异性结合,但却不能与PMXM发生结合,而PMDH和PMXM是微小原甲藻(*P. minimum*)的不同细胞株,因此DBA、SBA、PNA和LCA能区分微小原甲藻的不同株。SBA探针不能和PDDH及PMXM发生结合,与PMDH结合也非常弱。所有的原甲藻藻株都能和PSA、PHA-L和S-WGA探针产生强烈的结合,但与探针PHA-E、SJA、RC120、UEA I的结合却很弱。探针ConA能强烈地标记PDDH,但与PMDH、PMXM的结合力很弱。GSL I和WGA探针均不能标记所有的原甲藻藻株。尽管PDDH、

PMXM和探针PNA的结合均为阳性,但其荧光定量的数值却具有统计学上的差异($P < 0.05$),具体数值为PDDH: 1+, 63%, 荧光强度为 $(3.46 \pm 0.78) \text{ ng (FITC) / } 10\,000 \text{ cells}$; 而PMDH: 1+, 6%, 荧光强度为 $(2.01 \pm 0.49) \text{ ng (FITC) / } 10\,000 \text{ cells}$, 详见表3、4。上述结果分析表明有4种细胞凝集素探针(DBA、SBA、PNA和LCA)可以区分微小原甲藻两株不同的细胞株PMDH和PMXM。

2.4 细胞凝集素探针在混合样品中区分和识别目标藻细胞

实验选用WGA细胞凝集素探针来区分本研究中的混合样品。这种探针能和目标藻细胞TPXM01发生特异性结合。荧光显微镜观察表明探针能从阴性非目标藻细胞中清楚地识别阳性目标藻细胞(图2)。

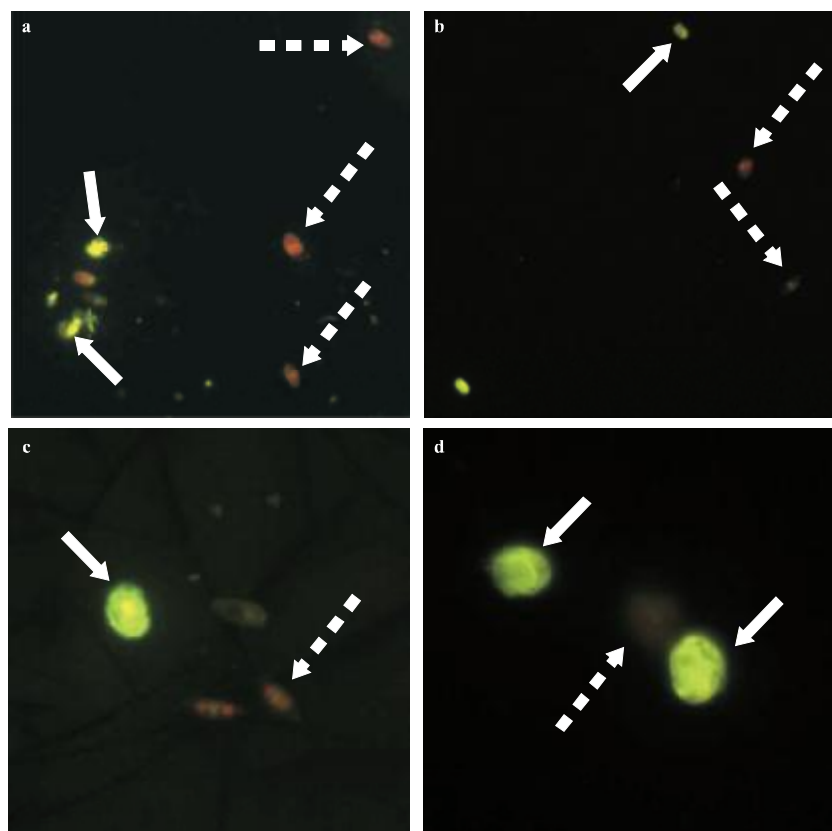


图2 荧光标记的细胞凝集素探针WGA在混合样品中检测目标赤潮藻TPXM01的荧光显微镜图片

注:实线箭头表示阳性标记细胞TPXM01;虚线箭头表示阴性细胞。

Fig.2 Epifluorescence micrographs showing representative labelling of target harmful algae TPXM01 from algae mixture using FITC-conjugated lectin probe WGA.

Note: Solid arrows indicate positive cells TPXM01, and dotted arrows indicate negative cells.

3 讨论

3.1 细胞凝集素探针对形态相似赤潮藻的鉴别

Hori 等^[10]研究认为,细胞凝集素及其糖基类受体普遍存在于各种不同的微藻中。用 FITC 标记的细胞凝集素探针能有效区分形态上十分相似的藻类^[7]。细胞凝集素也能区分从蓝藻到甲藻等类群中具有不同基因型的各种微藻^[1,3]。本研究也表明,细胞凝集素探针 SBA、WGA、GSL I、DBA、PHA-E 能根据其不同的结合能力区分形态相似的有害裸甲藻 GMDH01、TPXM01 及 GSPXM01 株。Rhodes 等^[7]用细胞凝集素探针区分了形态上相似的微小亚历山大藻和 *Cachonina hallii*, 以及米氏凯伦藻 (*Karenia mikimotoi*) 和裸甲藻 (*Gymnodinium* sp.)、纤小裸甲藻 (*Takyama pulchellum* 原名 *G. pulchellum*) 等。Costas 等^[1]也用细胞凝集素探针区分了形态相似的链状裸甲藻 (*G. catenatum*) 和 *G. impudicum*, 微小亚历山大藻和 *A. lusitanicum*; Cho 等还区分了形态相似的 *Cochlodinium polykrikoides* (CP-1) 和 *Gymnodinium* A3 (GA3-1)^[2], *Pseudo-nitzschia multiseries* 和 *P. pungense*^[12-14], 以及 *Cochlodinium polykrikoides* 和 *G. impudicum*、*G. catenatum*^[15] 等。

3.2 细胞凝集素探针对同种藻中不同细胞株及有毒和无毒藻株的鉴别

本研究结果显示,一些细胞凝集素探针能区分来自相同和相邻地理位置的同种亚历山大藻不同细胞株,诸如 ATMJ01 对 ATMJ02, ATDH01、ATDH02、ATDH03 对 ATDH04, ATCI01-JN、ATCI01 对其余的塔玛亚历山大藻细胞株以及微小原甲藻 PMDH 对 PMXM,细胞凝集素也能区分产毒水平不同的细胞株,如产生较低水平的麻痹性贝毒 (PSP) 的 ASPGX01 和产生高水平麻痹性贝毒的 ASPGX02 (张树刚,私人交流)。Rhodes^[16]指出,来自不同地理位置的同种藻细胞株与细胞凝集素的结合情况不同。研究报道指出,不同地理起源的 *A. ostensfeldii* 细胞株与细胞凝集素探针结合能力没有明显差异,尽管它们产毒情况也不同;在原甲藻方面,两株利玛原甲藻 (*P. lima*) 分别来自西班牙和新西兰朗高奴湾 (Rangaunu), 其与细胞凝集素探针的结合能力也并无不同之处^[7]。上述结果和 Aguilera 等^[17]的发现不尽相同,他们将细胞凝集素探针与 2 株亚历山大藻 (微小亚历山大藻 *A. excavata*), 3 株 *A. affine* 标记后发现这些探针能

对这些亚历山大藻的种类进行有效区分,尽管区分的特异性有差异。究竟细胞凝集素探针能否区分同种甲藻的不同地理株,或者产毒水平不同的细胞株,尚待继续深入的研究。

3.3 细胞凝集素对不同赤潮藻进行区分和鉴别的机理探讨

细胞凝集素的特点和特异之处体现在其能特异性地与细胞表面的糖基如葡萄糖、甘露糖、半乳糖、*N*-乙酰基-D-半乳糖胺、*N*-乙酰氨基葡萄糖、岩藻糖等基团结合 (表 2)^[18]。细胞表面的糖基组成作为细胞表面的特征成分,可以作为分类的依据之一^[2-3,18]。细胞凝集素具有识别细胞表面特异性糖基的能力,因此荧光标记的细胞凝集素就能作为种类鉴别的探针^[2-3,7]。糖竞争抑制实验的结果表明,在不同微藻的细胞表面普遍存在着各种糖基类的细胞凝集素受体位点^[2,7,10]。不同藻类细胞表面的糖基组成不同,导致细胞凝集素结合能力和特征也有差异,从而可进行有效区分和鉴别。本研究结果表明,形态相似、产毒有差异、地理起源不同或相近的同种或不同赤潮藻细胞株,其细胞表面都可能存在着不同的糖基成份,因此只有相应的细胞凝集素探针才能有针对性地对这些赤潮藻株进行区分。

研究表明,细胞凝集素结合能力是每株藻自身的一种遗传特性^[4]。这可从两方面去解释,首先,水平基因转移通常发生在同种或者不同种或属的细胞之间^[19]。通过基因突变和基因漂移,这些细胞株随着时间推移而逐渐累积基因差异。如果这些基因突变影响了控制细胞表面形态的基因或控制细胞表面糖基组成的基因,与细胞凝集素的结合能力就会发生变化^[4]。其次,由于甲藻多为无性繁殖,自然海域中的甲藻存在着大量克隆品系。由于基因突变导致其种内产生变异,从而引起同种的相同或不同地理株系之间形成一定的遗传差异^[20],从而体现出细胞凝集素结合模式的差异。正是由于细胞表面存在不同的糖蛋白或糖脂的客观事实^[18],甲藻细胞表面特征才可以用不同的细胞凝集素探针来进行标记和识别。本实验结果显示,在鉴别和区分系统发生上密切相关的近源种及同种赤潮藻不同细胞株之间的差异方面,细胞凝集素探针的确是非常有用的工具。细胞凝集素探针的弱点是容易产生背景噪音,有时在区分和识别不同样品的靶细胞时存在一定困难,而 DNA 和抗体探针与细胞凝集素探

针相比有相对较小的背景噪音干扰^[3-4]。在几种探针的比较方面, Cho 等^[15]使用细胞凝集素探针对韩国海域中有害甲藻 *Cochlodinium polykrikoides* 进行检测的结果表明,在混合样品中采用抗体、细胞凝集素探针(WGA 和 ECA)计数目标细胞数量结果的相关性很好,且检测限可低到 5 cells/mL。

3.4 细胞凝集素探针检测技术的研究现状、意义及应用

由于一些有毒藻很难识别,即便是训练有素的专业人员鉴定起来仍然存在困难。基于这个原因,人们开发了许多新的检测技术用来区分形态上相似的赤潮生物,用来鉴别有毒和无毒的赤潮藻类,以及区分一些赤潮藻种中不同的细胞株^[21]。在这些检测方法中,DNA 探针、SEM 和 HPLC 等技术虽然有效但却昂贵耗时^[22],而细胞凝集素探针是赤潮检测中相对快速、简单的方法^[2]。在检测手段中,荧光显微镜是检测 FITC 标记 DNA 或细胞凝集素探针染色效果的主要检测手段^[2-3,7],但这种方法定量不太方便,且欠精确。荧光分光光度计可以定量检测探针标记的荧光强度,但在该领域中的应用较少见^[3-4]。FCM 是一种更为灵敏的检测手段,能快速检测和分析目标细胞标记后的荧光信号并能对其进行定量,比荧光显微镜和荧光分光光度计检测时间更短更精确,也能提供藻细胞的光合色素、DNA、蛋白等相关的定量信息。FCM 结合细胞凝集素探针在有害赤潮生物检测和区分方面的应用研究尚未见报道。上述分析显示出本研究的创新性所在。目前细胞凝集素探针检测应用的主要问题在于检测方法过于单一,量化手段不够,且探针使用的数量有限。本研究集合较多的细胞凝集素探针(14 种),结合荧光显微镜、荧光分光光度计、FCM 3 种检测方法,采取定性和定量手段相结合,有效地检测和区分了来自中国近海的形态相似、有毒和无毒、地理来源相同或相近、同属或同种不同细胞株等不同层次分类关系的赤潮生物,结果表明这些探针具有较好的特异性和检测效果,定性和定量的检测结果较为一致,是未来利用于现场赤潮生物检测的可选工具。

致谢:厦门大学环境科学研究中心王大志教授和国家海洋局第三海洋研究所顾海峰博士提供了部分实验藻种;厦门大学环境科学研究中心林丽贞和胡俊博士给予了大量的实验协助,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] Costas E, Zardoya R, Bautista J. et al. Morphospecies vs. genospecies in toxic marine dinoflagellates: an analysis of *Gymnodinium catenatum*/*Gyrodinium impudicum* and *Alexandrium minutum*/*A. lusitanicum* using antibodies, lectins and gene sequences[J]. J Phycol, 1995, 31: 801-807.
- [2] Cho E S, Seo G M, Lee S G, et al. Application of FITC-conjugated lectin probes for the recognition and differentiation on some Korean coastal red tide microalgae[J]. J Fish Sci Technol, 1998, 1: 250-254.
- [3] Costas E, Rodas V L. Identification of marine dinoflagellates using fluorescent lectins[J]. J Phycol, 1994, 30: 987-990.
- [4] Rodas V L, Costas E. Characterization of morphospecies and strains of *Microcystis* (cyanobacteria) from natural populations and laboratory clones using cell probes (lectins and antibodies) [J]. J Phycol, 1997, 33: 446-454.
- [5] 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.
- [6] Chan L L, Hodgkiss I J, Lam P K S. Use of two-dimensional gel electrophoresis to differentiate morphospecies of *Alexandrium minutum*, a paralytic shellfish poisoning toxin-producing dinoflagellate of harmful algal blooms[J]. Proteomics, 2005, 5: 1580-1593.
- [7] Rhodes L L, Haywood A J, Fountain D W. FITC-conjugated lectins as a tool for differentiation between toxic and non-toxic marine dinoflagellates[J]. N Z J Mar Freshw Res, 1995, 29: 359-365.
- [8] Goldstein I J, Hughes R C, Monsigny M et al. What should be called a lectin? [J]. Nature, 1980, 285: 66-69.
- [9] Sharon N, Lis H. Lectins [M]. New York, USA: Chapman and Hall Press, 1989: 188-286.
- [10] Hori K, Ogata T, Kamiya H, et al. Lectin-like compounds and lectin receptors in marine microalgae: hemagglutination and reactivity with purified lectins[J]. J Phycol, 1996, 32: 783-790.
- [11] Kim G H, Lee I K, Fritz L. The wound-healing responses of *Antithamnion nipponicum* and *Griffithsia pacifica* (Ceramiales, Rhodophyta) monitored by lectins[J]. Phycol Res, 1995, 43: 161-166.
- [12] Cho E S, Kodaki Y, Park J G. The comparison of two strains of toxic *Pseudo-nitzschia multiseries* (Hasle) and non-toxic *Pseudo-nitzschia pungens* (Grunow) Hasle isolated from Chinhae Bay, Korea[J]. Algae, 2001, 16: 275-285.

- [13] Cho E S, Choi B D, Cho Y C, et al. Discrimination of three highly toxic *Alexandrium tamarense* (Dinophyceae) isolates using FITC-conjugated lectin probes[J]. J Plankt Res, 2001, 23(1): 89–95.
- [14] Cho E S, Hur H J, Byun H S, et al. Monthly monitoring of domoic acid producer *Pseudo-nitzschia multiseries* (Hasle) using species-specific DNA probes and WGA lectins and abundance of *Pseudo-nitzschia* species (Bacillariophyceae) from Chinhae Bay, Korea[J]. Bot Mar, 2002, 45: 364–372.
- [15] Cho E S, Costas E. Rapid monitoring for the potentially ichthyotoxic dinoflagellate *Cochlodinium polykrikoides* in Korean coastal waters using fluorescent probe tools[J]. J Plankt Res, 2004, 26(2): 175–180.
- [16] Rhodes L L. Identification of potentially toxic *Pseudo-nitzschia* (Bacillariophyceae) in New Zealand coastal waters, using lectins[J]. N Z J Mar Freshw Res, 1998, 32: 537–544.
- [17] Aguilera A, Lopez-Rodas V, Gonzalez-Gil S, et al. Use of FITC- labelled lectins to identify dinoflagellate species[C]// Lassus P, et al. Harmful marine algal blooms. Lavoisier: Intercept Ltd, 1995: 707–710.
- [18] Slifkin M, Doyle R J. Lectins and their application to clinical microbiology[J]. Clin Microbiol Rev, 1990, 3: 197–218.
- [19] Lorentz M G, Wackernagel W. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment[J]. Microbiol Rev, 1994, 58: 563–602.
- [20] Costas E. Genetic variability in growth rates of marine dinoflagellates[J]. Genetica, 1990, 83: 99–102.
- [21] 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.
- [22] Cho E S, Kim G Y, Choi B D, et al. The comparative study of dinoflagellates *Cochlodinium polykrikoides* and *Gyrodinium impudicum* using transmission electron microscope, fatty acid composition, carotenoid content, DNA quantification and gene sequences[J]. Bot Mar, 2001, 44: 57–66.

Quantitative detection of harmful algae species using lectin probes

HUANG Hui¹, WU Mo-ge², LEI Hong-ling³, LAI Hong-yan^{3,4}, HOU Jian-jun^{3,4}

(1. Department of Fisheries, Southwest University, Rongchang 402460, China; 2. Department of Biology, Puyang Vocation-Technical College, Puyang 457000, China; 3. Key Laboratory of Biologic Resources Protection and Utilization of Hubei Province Hubei Institute for Nationalities, Enshi 445000, China; 4. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Lectins are carbohydrate-binding proteins of nonimmune origin that agglutinate cells or precipitate glycoconjugates, and they have been found in a wide range of organisms from bacteria to higher vertebrates. They are non-enzymatic secretory proteins or glycoproteins that play important physiological roles as recognition molecules within cell, between cells, or between organisms. Because of the ability of lectins to discriminate specific carbohydrate structures and the molecules' biological activities, lectins are useful as probes for carbohydrate structures studies in many areas of biological research. Many researches have been done using lectins to detect and differentiate harmful algae. However, there has been limited work on quantification of bound lectins, and the lectin probes used are not specific enough to detect HAB species whose taxonomies are still unclear. There has been little work on utilization of FITC-conjugated lectins for identifying and differentiating harmful microalgae collected from coastal waters in China. In the present study, 14 lectin probes were used to assess their specificity (both quality and quantity) on Chinese harmful algae using different detection methods, such as flow cytometry (FCM), epifluorescence microscopy (EFM) and spectrofluorometer (SFM). The purpose of the study was to identify lectins that can distinguish morphologically similar, toxic and nontoxic algae in coastal waters in China. Results showed that each of the tested *Gymnodinium* species bound to most of the tested lectin probes, except GMDH01 strain to probe PHA-E, SBA, WGA and GSL I, TPXM01 strain

to probe PHA-E and GSL I, CCMP1740 strain to probe PHA-E. GIXM01 could be differentiated by DBA probe from other *Gymnodinium* species, and SBA, WGA could discriminate morphologically similar GMDH01 and TPXM01 from each other. The efficiency of GSL I and PHA-E probe was not strong enough to distinguish different *Gymnodinium* species. Although GMDH01 and TPXM01 were similar in morphology and both could be stained faintly by PNA, the differences in the quantitative fluorescence values were statistically significant ($P<0.05$). PHA-E could differentiate ATDH04 (*Alexandrium tamarense*) from other strains of the species, and SJA could distinguish ATMJ02 (*A. tamarense*) from other strains of the species (including ATMJ01). Similarly PNA could identify *A. tamarense* (ATDH01, 02, 03) and UEA I could recognize *A. tamarense* (ATCI01-JN, ATCI01) from other strains of the same species. RCA120 could differentiate *Alexandrium* sp (ASPGX01) from ASPGX02, which was shown to produce different levels of paralytic shellfish poison (PSP). PMDH could be stained by DBA, SBA, PNA and LCA, but PMXM01 could not be stained. PMXM01 and PMDH01 (different strains of *P. minimum*) could be differentiated by SBA, LCA, DBA and PNA. All the tested *Prorocentrum* species bound PSA, PHA-L and S-WGA firmly, and bound PHA-E, SJA, RCA120 and UEA I infirmly. PDDH01 bound ConA strongly but bound PMDH01, PMXM01 weakly. None of the tested *Prorocentrum* species bound GSL I and WGA. Though PDDH01 and PMXM01 showed some affinities to the PNA probe, the quantitative fluorescence values were different. Lectin probes could also bind these target cells in mixed algal samples. The positive cells were clearer than negative ones identified by FCM and EFM, GSPXM01 and TPXM01 labelled with WGA lectin probe could be distinguished from cells of *G. mikimotoi*, *Prorocentrum donghaiense* and *P. minimum* (PMDH01, PMXM01) in mixed algal samples. FCM, EFM and SFM analysis could clearly distinguish lectin probe-bound cells from the negative cells in the culture. All results suggested that these probes and protocols might be useful tools to monitor *in situ* distribution of bloom-forming taxa, such as *Gymnodinium*, *Prorocentrum*, *Alexandrium* and *A. tamarense* in natural water. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (2): 279–292]

Key words: lectin probe; harmful algal bloom (HAB) species; identification; flow cytometry (FCM); epifluorescence microscopy (EFM); spectrofluorometry (SFM)

Corresponding author: HOU Jian-jun. E-mail: jjhou@mail.hzau.edu.cn