

# 海洋沉积物样品细胞提取及荧光显微镜计数法

## Cell Extraction of Sediment Samples and Fluorescence Microscope Counting Method

牛明杨<sup>1, #</sup>, 贾泽宇<sup>1, #</sup>, 王风平<sup>2, \*</sup>

<sup>1</sup>生命科学技术学院, 上海交通大学, 上海; <sup>2</sup>海洋学院, 上海交通大学, 上海

\*通讯作者邮箱: fengpingw@sjtu.edu.cn

#共同第一作者

**摘要:** 本实验建立了从海洋沉积物中分离和收集细胞的方法。主要利用 EDTA, 吐温 80, 焦磷酸钠和甲醇作为分离洗脱剂, 结合低频率超声处理和 Nycodenz 密度离心, 从而有效地将细胞从沉积物颗粒上洗脱分离出来, 同时减少细胞在洗脱分离过程中的破碎率。此方法适用于不同沉积物样品中细胞的提取, 且通过 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜收集细胞, 经过 SYBR Green I 染色, 可在荧光显微镜下对细胞进行观测和计数。

**关键词:** 沉积物细胞提取, 细胞染色, 细胞计数, 荧光显微镜

### 实验基本原理

海洋沉积物中含有大量的矿物质和有机质等颗粒, 微生物会附着在颗粒物的表面或者被这些颗粒物包裹。这会阻碍我们对沉积物中微生物多样性和生态功能的研究。本实验主要通过化学试剂对颗粒物进行溶解、超声破碎和密度梯度离心的方法使细胞和颗粒物分离, 并收集细胞。实验可分为 3 个步骤, 基本原理如下:

1. 甲醛溶液固定细胞: 甲醛可以与细胞中某些氨基酸结合发生反应, 使蛋白质交联, 致使细胞失活, 起到固定细胞的作用。

2. 化学、超声剥离细胞: 沉积物颗粒物中含有大量的碳酸盐和矿物质, 化学法是利用乙酸溶解碳酸盐, 使附着在碳酸盐颗粒上的细胞解离; 而加入甲醇和去污剂溶液 (吐温和焦磷酸) 有助于有机质 (蛋白质) 颗粒的解聚和溶解。而 EDTA 可以螯和金属离子, 改变矿物对细胞的吸附。超声的方法可以打碎细胞团或者颗粒, 有助于细胞的脱离颗粒物。

3. 密度梯度离心：可以利用不同浓度的 Nycodenz 溶液配制成密度梯度，通过离心，使得不同密度的细胞分布在不同的密度梯度中，大颗粒沉降到管底。实现细胞与颗粒物分离的目的。

4. 荧光染色：荧光染色是通过 SYBR Green I 染液，是一种能够结合双链 DNA 双螺旋小沟区域的具有绿色激发波长的染料，在游离状态下，SYBR Green I 发出微弱的荧光，但是与双链 DNA 结合后，荧光强度大大增强。可以通过荧光显微镜检测到荧光信号。

## 材料与试剂

### 实验试剂：

1. 多聚甲醛 (上海泰坦科技有限公司, catalog number: 410730010)
2. NaCl (国药集团化学试剂有限公司, catalog number: S9625-500G)
3. 10X 磷酸缓冲盐溶液 (10 X PBS 溶液, pH =7.4, Sigma, catalog number: P5368)
4. 乙酸钠 (Sigma, catalog number: S5636)
5. 乙酸 (Sigma, catalog number: A6283)
6. Nycodenz (Axis-Shield, catalog number: 1002424)
7. SYBR Green I 10000×原液 (Invitrogen™, catalog number: S7563)
8. 甘油(国药集团化学试剂有限公司, catalog number: G7757-500ML)
9. 甲醇(国药集团化学试剂有限公司, catalog number: 179957-1L)
10. 0.5 M 乙二胺四乙酸二钠溶液 (北京索莱宝科技有限公司, catalog number: E1170)
11. 十水焦磷酸钠 (国药集团化学试剂有限公司, catalog number: 205975000)
12. 吐温 80 (国药集团化学试剂有限公司, catalog number: 278632500)
13. 沉积物细胞固定液 (见溶液配方)
14. 醋酸缓冲液 (pH = 4.6) (见溶液配方)
15. 3%的 NaCl 的 PBS 溶液(见溶液配方)
16. 1X 磷酸盐缓冲液(见溶液配方)
17. 去污剂混合液 (见溶液配方)

18. 梯度密度 Nycodenz 溶液 (见溶液配方)

19. 100 X SYBR Green I 染液 (见溶液配方)

20. 50%甘油保护液 (见溶液配方)

## 实验器材:

1. 离心管 (2mL, Axygen, USA, catalog number: MCT-200-C)

2. 肖特瓶 (100mL, Schott, German, catalog number: 21801245)

3. 0.22  $\mu$ m 聚碳酸纤维膜 (GTBP) (Millipore, Billerica, MA, USA, catalog number: GTBP02500)

4. 滤膜衬垫纸 (whatman GF/C, catalog number: 1822-055)

5. 0.22  $\mu$ m 针式过滤器 (Millex<sup>®</sup> GP, catalog number: SLGPR33RB)

6. 布氏漏斗 (PALL, USA, 25mm, catalog number: 4204)

7. 胶塞 (成阳实验室, catalog number: 10025574028902)

8. 抽滤瓶 (蜀牛玻璃抽滤瓶 500ml, catalog number: 45264074266)

## 仪器设备

1. 离心机 (Eppendorf 5430 德国 Eppendorf 公司)

2. 涡旋仪 (Vortex Genie<sup>®</sup> 2 Vortex, 美国 MO BIO 公司)

3. 移液枪 (10  $\mu$ l, 200  $\mu$ l, 1 ml, 德国 Eppendorf 公司)

4. 高压灭菌锅 (G154DWS, 中国 致微 (厦门) 仪器有限公司)

5. 配备 FITC 滤光块的 Nikon ECLIPSE 90i 全自动科研级显微镜 (ECLIPSE 90i, 日本 Nikon 公司)

6. 真空泵 (津腾 GM-0.5B, 中国津腾公司)

7. 超声波破碎仪 (Thermofisher, FB50220, 美国 Thermofisher 公司)

8. 电磁加热搅拌器 (TH-500, 中国, 上海沪西分析仪器厂)

9. 耐高温磁性搅拌子

## 实验步骤

### 一、实验器材灭菌

1. 滤膜衬垫纸放入超净台，打开紫外灯灭菌 30min。布氏漏斗，胶塞和抽滤瓶 121 °C 高压灭菌，然后烘干使用。
2. 需有阴性对照确保各环节试剂无污染。即过滤各所用试剂对应体积于滤膜上，对滤膜进行 SYBR Green 染色计数。确保未能观察到固定不动的微生物。

## 二、样品处理

1. 沉积物样品用沉积物细胞固定液，按照体积比例，以 1:5（样品 1 份，固定液 5 份）的比例稀释和固定样品，用涡旋仪（Vortex）混匀；4 度保存 20 min，然后取 100 µl 固定样品，装入 2 ml 离心管进行细胞提取（可以多几个平行样品）；
2. 在超净台中，向 100 µl 的稀释样品中加入 500 µl 醋酸缓冲液（pH = 4.6），盖上管盖，放在室温下反应两小时，每半小时开一次管盖，以排出 CO<sub>2</sub>；
3. 3,000 × g 离心 10 min，离心结束后，将上清转移到干净的 2 ml 离心管中，收集待测；
4. 上述步骤离心后的沉淀即为除碳酸盐后的沉积物，向该沉淀中加入 400 µl 含有 3.5%（w/v）NaCl 的 PBS 溶液，重新悬浮沉淀，并加入 50 µl 的去污剂混合液和 50 µl 的甲醇；
5. 用注射器在样品悬液底部分别依次缓慢加入 500 µl 30%、50% 和 80%(w/v) Nycodenz 溶液（视频）；
6. 3,000 × g 离心 10 min，从最表面吸取液体，将上清转移至干净的离心管内，收集待测；  
*注：不要跟第 3 步的上清液放在一个管内，否则 EDTA 会和 Ca 离子螯合，产生沉淀。*
7. 弃去管内剩下的 Nycodenz 溶液，用 400 µl 3.5%NaCl 的 PBS 溶液将管内沉淀重悬，并加入去污剂混合液和甲醇各 50 µl；
8. 将 2mL 离心管置于冰水混合物上，超声波探头插入冰水下 3 cm 并距离离心管 5 cm，15 W 超声，每次 10 s，间隔 20 s，一共 5 次（超声波探头放置位置见视频）；
9. 重复第 5-6 两步（加 Nycodenz，离心，取上清），将上清液装入无菌离心管中，收集待测；

10. 将上述获得的三部分上清液过滤到 0.22  $\mu\text{m}$  滤膜上。先用无菌水润洗漏斗两次，垫上滤膜衬垫纸，用无菌水润湿，开泵将纸垫吸附在漏斗上，加入 5 ml 3.5% NaCl 的 1XPBS 溶液，静置 2~3 min 检测是否漏液。如果不漏液的话，再加入上清搅匀后再打开真空泵抽滤，使液体全部过滤完，以保证所有细胞在膜上分布均匀。若漏液，重新组装各部分并再次检验是否漏液。
11. 在超净台内，将滤膜放置在无菌培养皿上，用移液器吸取 100  $\mu\text{l}$  100 X SYBR Green I 染液均匀滴加在滤膜上，避光染色 30 min 后，用无菌滤纸，放在滤膜边缘吸干多余的染液；
12. 加入 40  $\mu\text{l}$  50%的甘油作为防淬灭剂和折光介质覆盖在滤膜上，压上盖玻片，除去气泡，用配置有 FITC 通道或等效通道的荧光显微镜检测。
13. 打开 FITC 荧光显微镜，将载玻片放在显微镜的载物台上固定，10 倍镜粗调焦距，40 倍镜下细调焦距，在明场下观察滤膜至能清晰分辨滤膜表面的纹理，表明此时焦平面已调节至滤膜表面附近，找到目标视野，在盖玻片上滴少量镜油，再放入载物台上，转换成油镜，并且切换显微镜至荧光观察模式，选择荧光通道 GFP 或等效滤光块。样品中微生物细胞应呈明亮绿色荧光，且形态符合一般生物外形。沉积物中部分杂质也会吸附荧光分子并呈现类似荧光信号，可以转换荧光信号到 Tex red 荧光通道，如果颗粒仍旧有红光，有可能是沉积物颗粒，而非细胞，应小心分辨。
14. 细胞计数，对于每个滤膜，随机挑选 16 个目镜视野，拍照后统计视野中微生物总数  $a$ 。每个样品应有数个平行组过滤在相应数量  $b$  的滤膜上。为使结果可信，应满足  $\sum_{i=1}^b a_i > 1000$  (个)。
15. 估算每张滤膜上的微生物总数  $c = \frac{a}{16} \times \frac{1}{4} \pi d^2$ 。其中， $m$  为视野面积， $a$  为该滤膜上 16 个视野中微生物总数， $d$  为漏斗接触滤膜处内径。估算原始样品中微生物数量  $x = \frac{c}{bV}$ ，其中， $V$  为计算得到的过滤至单一滤膜上的原始样品体积， $b$  为平行组数量。
16. 观察并拍照，保存合适的图片用于细胞计数。

17. 观察和拍照结束后，关闭所有光源，用二甲苯擦拭油镜物镜端镜头，将载物台调整至原始位置，换镜转盘转换到空镜头位。

## 溶液配方

### 1. 沉积物细胞固定液（4%（w/v）多聚甲醛溶液）

在通风橱内称取 4 g 多聚甲醛，0.1 g 氢氧化钠，以及 2 g 氯化钠，加入 90 mL 1X PBS 缓冲液中，放入磁力搅拌子，在磁力搅拌器上溶解。待白色颗粒完全溶解后，使用 1 M 盐酸溶液调节 pH 为 7.0 左右并补充 1X PBS 至 100 mL，并使用 0.22  $\mu$ m 无菌的针式过滤器将该溶液收集于无菌玻璃瓶内，保存于 4°C，现配现用。

### 2. 1X 磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline, PBS）

取 100 mL 10×磷酸盐缓冲液（pH = 7.4），稀释于 800 mL 蒸馏水中，补充去离子水至 1000 mL，121°C 高压灭菌 20 min，冷却至室温待用。

### 3. 含有 3.5% NaCl 的 PBS 溶液

称取 3.5 g NaCl，加入到 100 mL 去 1 X PBS 溶液中，121°C 高压灭菌 20 min，冷却至室温待用。

### 4. 醋酸缓冲液(pH = 4.6)

量取 2 ml 乙酸，称取 3.5 g 醋酸钠和 3.3 g NaCl，加入 80 mL 去离子水，再加入 5 ml 40% 甲醛溶液混合均匀，定容至 100 ml，用稀盐酸调节溶液 pH = 4.6，用 0.22  $\mu$ m 无菌滤膜过滤至无菌的玻璃瓶中，室温保存。

### 5. 去污剂混合液

量取 0.5 M 乙二胺四乙酸钠溶液（Ethylene Diamine Tetra acetic Acid, EDTA, pH 8.0）2 mL，称取焦磷酸钠 0.266 g 加入到 EDTA 中，再取 0.1 mL 吐温-80（Tween 80）加入到溶液中，补充去离子水至 10 mL。用 0.22  $\mu$ m 无菌针式过滤器过滤至无菌的玻璃瓶中，避光室温保存。

### 6. 梯度密度 Nycodenz 溶液

称取 30 g，50 g 和 80 g Nycodenz 粉末，分别加入到 80 mL 去离子水中，并定容至 100 mL，配制成质量体积分数为 30%、50% 和 80%（w/v）的 Nycodenz 水溶液。然后使用无菌的针式过滤器过滤灭菌，并收集在避光的无菌离心管中，4 °C 保存。

### 7. 100 X SYBR Green I 染液



避光环境下，在超净台中用移液器吸取 10  $\mu$ l SYBR Green I 10,000 $\times$ 原液，加入到装有 990  $\mu$ L 无菌去离子水的 2 mL 离心管中，离心管外壁包上铝箔避光，在 vortex 上混匀 1 min，4  $^{\circ}$ C 保存。

## 8. 50%甘油保护液

量取 50 ml 甘油，加入 50 ml 无菌去离子水，用 0.2  $\mu$ m 无菌滤膜过滤，保存至无菌的玻璃瓶中，室温保存。

## 致谢

本实验方案摘自 Jens Kallmeyer 发表的文章 New cell extraction procedure applied to deep subsurface sediments: Cell extraction of deep subsurface sediments。

## 参考文献

1. Kallmeyer, J., *et al.* (2008). [New cell extraction procedure applied to deep subsurface sediments: Cell extraction of deep subsurface sediments.](#) *Limnology and Oceanography: Methods* 6: 236-245.