**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1, #，贾泽宇1, #，王风平2, \*

1生命科学技术学院，上海交通大学，上海；2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 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 (InvitrogenTM, 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 μm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 μm针式过滤器 (Millex® 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® 2 Vortex，美国MO BIO公司)
3. 移液枪 (10 μl, 200 μl, 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 (可以多做几个平行样品)；
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CO2；
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。*

1. 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；
2. 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）；
3. 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；
4. 将上述获得的三部分上清液过滤到0.22 μm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。
5. 在超净台内，将滤膜放置在无菌培养皿上，用移液器吸取100 μl 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；
6. 加入40 μl 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。
7. 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。
8. 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 > 1000 (个)。
9. 估算每张滤膜上的微生物总数 c = 。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 = ，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。
10. 观察并拍照，保存合适的图片用于细胞计数。
11. 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 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℃，现配现用。

1. 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℃高压灭菌20 min，冷却至室温待用。

1. 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℃高压灭菌20 min，冷却至室温待用。

1. 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80mL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 m无菌滤膜过滤至无菌的玻璃瓶中，室温保存。

1. 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 m无菌针式过滤器过滤至无菌的玻璃瓶中，避光室温保存。

1. 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 ℃保存。

1. 100 X SYBR Green I染液

避光环境下，在超净台中用移液器吸取10 μl SYBR Green I 10,000×原液，加入到装有990 μL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 保存。

1. 50%甘油保护液

量取50 ml甘油，加入50 ml无菌去离子水，用0.2μm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**

Kallmeyer, J., *et al.* (2008). [New cell extraction procedure applied to deep subsurface sediments: Cell extraction of deep subsurface sediments](https://aslopubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.4319/lom.2008.6.236). *Limnology and Oceanography: Methods* 6: 236-245.